



Les protéines de stress HSP90 et Gp96 dans la maladie du greffon contre l'hôte : implication physiopathologique, diagnostique et thérapeutique

Antoine Seignez

► To cite this version:

Antoine Seignez. Les protéines de stress HSP90 et Gp96 dans la maladie du greffon contre l'hôte : implication physiopathologique, diagnostique et thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS047 . tel-01280244

HAL Id: tel-01280244

<https://theses.hal.science/tel-01280244>

Submitted on 29 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

École Doctorale Environnements – Santé – STIC

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Discipline : Sciences de la Vie

par

Antoine SEIGNEZ

Présentée et soutenue publiquement le 13 novembre 2015

Les protéines de stress HSP90 et Gp96 dans la maladie du greffon contre l'hôte : implication physiopathologique, diagnostique et thérapeutique

Directrice de thèse Pr. Évelyne Kohli

JURY

Dr Carmen Garrido

Pr Éric Solary

Dr Marie-Agnès Dragon-Durey

Dr Béatrice Gaugler

Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

École Doctorale Environnements – Santé – STIC

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Discipline : Sciences de la Vie

par

Antoine SEIGNEZ

Présentée et soutenue publiquement le 13 novembre 2015

Les protéines de stress HSP90 et Gp96 dans la maladie du greffon contre l'hôte : implication physiopathologique, diagnostique et thérapeutique

Directrice de thèse Pr. Évelyne Kohli

JURY

Dr Carmen Garrido

Pr Éric Solary

Dr Marie-Agnès Dragon-Durey

Dr Béatrice Gaugler

Examineur

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Il faut suivre sa pente, pourvu que ce soit en montant.

A. Gide

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier tous mes collaborateurs. Mme Kohli, Mme Garrido, je vous remercie vivement pour la qualité de votre encadrement et votre implication. Je remercie sincèrement les autres membres de mon jury, Mme Gaugler, Mme Dragon-Durey, rapporteurs, et M. Solary, pour votre disponibilité. Mes stagiaires, Mathilde, Michel, Killian, merci de votre sympathie et d'avoir participé au progrès de mes travaux. Je n'oublie pas Anne-Laure Joly, qui m'a formé à de nombreuses techniques et dont j'ai pris la suite de travaux passionnants. À tous mes autres collègues, Olivier, Kévin, Sarah, Margaux, Cindy, Ayswaria, Sophie, Nathalie, Oleg, Guillaume, Sébastien, Valentin, Gaëtan, Christophe, Arlette, Andreea et bien d'autres ! merci de créer une atmosphère agréable pour travailler dans le laboratoire. J'espère y contribuer.

Merci aussi à tous mes collègues qui travaillent dans une autre unité de recherche (Alice, Kader, Martin, Marion...), à la pharmacie (Alexandre, Jean-François, Caroline, Bao...) et au plateau technique de l'hôpital (Benoît, Guillaume, Pierre, Laurent, Géraud...), qu'il est plaisant de retrouver pour déjeuner et faire une petite pause avant de reprendre l'après-midi de travail.

Je remercie également ma famille, mes amis et toutes les connaissances qui m'ont accompagné durant ces trois années.

Résumé

L'allogreffe de cellules hématopoïétiques est une stratégie thérapeutique importante dans les hémopathies malignes. La maladie du greffon contre l'hôte (GvH) en est une complication majeure menaçant le pronostic vital. Elle est due à la reconnaissance des antigènes du receveur par les lymphocytes T du donneur et à l'activation de ceux-ci, à l'origine de dommages tissulaires. L'altération de la barrière intestinale joue un rôle critique dans la GvH.

La famille des protéines de choc thermique (HSP)90 comporte cinq membres dont trois cytosoliques dénommés HSP90, et un localisé dans le réticulum endoplasmique (RE), Gp96, qui peut être sécrété en cas de stress.

Nous montrons dans nos travaux de thèse que la 17AAG, un inhibiteur des HSP90, réduit la mortalité liée à la GvH dans un modèle murin. Cet effet est associé à une augmentation de la réponse au stress du RE dans les cellules épithéliales intestinales comme en atteste l'augmentation de l'épissage du facteur de transcription XBP-1, corrélée à une diminution du dommage tissulaire intestinal. Ces résultats permettent d'envisager une place pour la 17AAG ou d'autres inhibiteurs de HSP90 dans la prévention de la GvH chez l'homme.

D'autre part, nous montrons que Gp96 est sécrétée dans le sérum de patients développant une GvH aiguë sévère avec atteinte intestinale. Nous suggérons de valider la pertinence de Gp96 comme biomarqueur de GvH intestinale dans une étude de plus grande ampleur. Enfin, nous trouvons que Gp96 s'associe avec le composant 3 du complément, une protéine impliquée dans l'immunité innée et adaptative, et inhibe certaines de ses fonctions. Les conséquences fonctionnelles de cette association sont discutées.

Mots-clés : maladie du greffon contre l'hôte ; maladie du greffon contre l'hôte intestinale ; HSP90 ; Gp96 ; 17AAG ; complément C3.

Abstract

Allogeneic hematopoietic cell transplantation is a treatment for certain disorders including hematologic malignancies. Graft-*versus*-host-disease (GvHD) is a major, life-threatening complication. It is due to the recognition of recipient antigens by donor T cells, which activate and damage tissues. Intestinal barrier alteration plays a critical role in GvHD.

Heat shock proteins (HSP)90 include five members, three cytosolic members named HSP90, and one member localized in endoplasmic reticulum (ER) called Gp96 and able to gain extracellular level in case of stress.

We show in our thesis that 17AAG, a HSP90 inhibitor, reduces GvHD mortality in a mouse model. This effect is associated with an increase in ER stress pathway in intestinal epithelial cells as figured by transcription factor XBP-1 splicing, correlated to a decrease in intestinal tissue damage. These results suggest that 17AAG could be considered in GvHD prevention in human.

Moreover, we show that Gp96 is secreted in serum of patients developing an acute GvHD with intestinal involvement. We propose to validate the relevance of Gp96 as an intestinal GvHD biomarker in a larger study. Finally, we find that Gp96 associate with complement component 3, a protein involved in innate and adaptive immunity, and inhibit some of its functions. Functional consequences of this association are discussed.

Keywords: graft-*versus*-host disease; intestinal graft-*versus*-host disease; HSP90; Gp96; 17AAG; complement C3.

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations	9
Liste des figures et tableaux	10
Introduction	11
I) L'allogreffe de cellules hématopoïétiques et la maladie du greffon contre l'hôte	11
A) L'allogreffe de cellules hématopoïétiques : une thérapeutique difficile qui progresse	11
<i>Objectifs.....</i>	<i>11</i>
<i>Prélèvement.....</i>	<i>12</i>
<i>Conditionnement</i>	<i>12</i>
<i>Prise de greffe et chimérisme</i>	<i>13</i>
B) La maladie du greffon contre l'hôte, fruit du désordre.....	14
<i>L'histocompatibilité.....</i>	<i>14</i>
<i>Épidémiologie.....</i>	<i>17</i>
<i>Physiopathologie de la GvH aiguë.....</i>	<i>17</i>
<i>Microbiotes intestinal et cutané et maladie du greffon contre l'hôte.....</i>	<i>20</i>
<i>Manifestations cliniques.....</i>	<i>21</i>
<i>Diagnostic</i>	<i>22</i>
<i>Évaluation de la gravité de la maladie.....</i>	<i>23</i>
<i>Enjeu du traitement prophylactique : le moindre mal.....</i>	<i>24</i>
<i>Traitement</i>	<i>28</i>
<i>Maladie du greffon contre l'hôte chronique.....</i>	<i>29</i>
<i>Modèles au laboratoire</i>	<i>30</i>
II) Deux signaux de danger, et bien davantage.....	31
A) Les protéines de choc thermique	31
1) Vue d'ensemble.....	31
<i>Des chaperons moléculaires.....</i>	<i>31</i>
<i>Stress du réticulum endoplasmique</i>	<i>32</i>
<i>Classification.....</i>	<i>35</i>
2) La famille des HSP90.....	37
<i>Structure des HSP90</i>	<i>37</i>
<i>Une HSP90 relativement méconnue.....</i>	<i>37</i>
<i>Trois HSP90 très voisines</i>	<i>37</i>
<i>Préambule sur la glycoprotéine 96</i>	<i>39</i>

3) La glycoprotéine 96 en particulier	40
<i>Alias</i>	40
<i>Sa structure</i>	40
<i>Ses fonctions de chaperon endoplasmique</i>	41
<i>La glycoprotéine 96 membranaire et extracellulaire</i>	42
<i>Intérêt diagnostique de la glycoprotéine 96</i>	44
<i>Intérêt thérapeutique de la glycoprotéine 96</i>	44
B) Le composant C3 du complément	46
<i>Complément de quoi ?</i>	46
<i>Nomenclature</i>	47
<i>La fixation aux surfaces</i>	48
<i>Voies d'activation</i>	48
<i>Un système toujours au bord de s'activer</i>	51
<i>Les autres fonctions du complément : une fusée à plusieurs étages</i>	54
<i>Structure et clivage du composant C3</i>	55
<i>Complément et maladie du greffon contre l'hôte</i>	58
Objectifs de la thèse	60
Résultats	62
The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft versus host disease development	63
Extracellular Gp96 is a chaperone of complement C3 and a serum marker of severity in graft versus host disease	102
Discussion	135
Perspectives	148
I) À propos de nos travaux	148
II) Quelques perspectives plus abstraites	149
<i>Rôle de Gp96 à la surface de pathogènes</i>	149
<i>Les linéaments d'un système ?</i>	150
Conclusion	152
Bibliographie	154
Annexe	173

ABBREVIATIONS

17AAG : 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine

17AG : 17-amino-17-déméthoxygeldanamycine

α 2M : alpha-2-macroglobuline

alloCH : allogreffe de cellules hématopoïétiques

ATP : adénosine triphosphate

BiP : *immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*

C : composant (du complément)

CD : cluster de différenciation

CH : cellules hématopoïétiques

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice de l'antigène

CR : récepteur du complément

DAF : *decay-accelerating factor*

DAMP : *damage-associated molecular pattern*

Gp96 : glycoprotéine 96

GvH : maladie du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease*)

GvL : *graft-versus-leukemia*

HLA : *human leukocyte antigen*

HSP : protéine de choc thermique (*heat shock protein*)

HSPG : protéoglycane à sulfate d'héparane (*heparan sulfate proteoglycan*)

iC3b : C3b inactivé

IL : interleukine

MCP : *membrane cofactor protein*

MDSC : *myeloid-derived suppressor cell*

MICI : maladies inflammatoires chroniques intestinales

miHA : antigènes mineurs d'histocompatibilité (*minor histocompatibility antigens*)

MO : moelle osseuse

NK : *natural killer*

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*

REG-3 α : *regenerating islet-derived 3 α*

SCIN : *staphylococcal complement inhibitor*

TCR : récepteur cellulaire des lymphocytes T

TLR : récepteur *Toll-like*

TNF : facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*)

TRAP-1 : *TNF receptor-associated protein 1*

Treg : lymphocytes T régulateurs

UPR : réponse aux protéines mal repliées (*unfolded protein response*)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Cette liste ne comprend pas les figures intégrées aux articles.

Figure 1 : Alloréactions possibles après l'allogreffe de cellules hématopoïétiques.....	16
Figure 2 : Physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte.	20
Figure 3 : Protection des protéines par les HSP dans la cellule soumise à un stress.....	32
Figure 4 : Voies de réponse au stress du réticulum endoplasmique.....	34
Figure 5 : Fonctionnement d'une HSP90 cytosolique.	39
Figure 6 : Structure de Gp96.	41
Figure 7 : Évolution du nombre de publications annuelles sur le complément.....	47
Figure 8 : Voies d'activation de la cascade du complément.	50
Figure 9 Structure linéaire de C3 et ses principaux fragments de clivage.....	56
Figure 10 : Structure tridimensionnelle schématique de C3 et ses principaux fragments de clivage....	57
Figure 11 : Marquage immunohistochimique de Gp96 au niveau duodénal.....	138
Figure 12 : Activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte.....	139
Figure 13 : Clivage de C3b et iC3b par du sérum normal humain seul.....	142
Figure 14 : Survie de souris développant la GvH et recevant des doses de préparation de Gp96.....	147

Liste des tableaux

Tableau I : Évaluation du grade de la maladie selon le consensus de Keystone.....	24
Tableau II : Médicaments employés ou envisagés dans la prise en charge de la GvH.....	27
Tableau III : Nomenclature des familles HSP70 et HSP90.....	36
Tableau IV : Des régulateurs et des récepteurs du complément, en particulier de C3.....	52

INTRODUCTION

I) L'allogreffe de cellules hématopoïétiques et la maladie du greffon contre l'hôte

A) L'allogreffe de cellules hématopoïétiques : une thérapeutique difficile qui progresse

Objectifs

L'allogreffe de cellules hématopoïétiques (alloCH) consiste en la greffe de cellules hématopoïétiques (CH) d'un donneur humain à un receveur humain. Les CH greffées reconstituent l'hématopoïèse chez le receveur préalablement conditionné à la greffe et exercent une action immunitaire envers ses cellules cancéreuses ou déficientes (selon l'indication de la greffe) résiduelles (Barnes et al., 1956). Ainsi, l'alloCH vise à traiter des hémopathies malignes (leucémie myéloïde aiguë...) dans environ 90 % des cas, à guérir une hématopoïèse déficiente (formes sévères de β -thalassémies...) ou à traiter certaines maladies génétiques concernant les cellules sanguines (hémoglobinurie paroxystique nocturne...). En 2009, plus de 25000 alloCH ont été effectuées dans le monde ; en 2011, presque 1800 en France (Agence française de Biomédecine) ; ces chiffres sont en croissance.

À la suite d'une alloCH, l'hématopoïèse et le système immunitaire du receveur procèdent des cellules du donneur. Ces cellules sont donc allogéniques (elles ressortissent d'un autre individu de la même espèce). Les reconnaissant comme étrangers, les cellules du système immunitaire peuvent donc déclencher une réponse immunitaire contre les tissus de l'organisme où elles ont été greffées, provoquant une pathologie grave appelée maladie du greffon contre l'hôte (GvH pour *graft-versus-host* en anglais).

Prélèvement

Chez le donneur, les CH peuvent être prélevées dans la moelle osseuse (MO) ou dans le sang périphérique. Dans ce dernier cas, des facteurs de croissance administrés au donneur induisent la libération de cellules souches de la moelle osseuse dans le sang, récupérées par cytophérèse. Pour le donneur, le prélèvement des CH dans le sang périphérique ne nécessite pas d'anesthésie générale et le risque de complication (non recouvrement d'une hématopoïèse normale, par exemple) est mineur (Pulsipher et al., 2013).

Une alloCH apparentée (c'est-à-dire entre membres d'une fratrie) effectuée à partir de sang périphérique a de meilleurs résultats en termes de survie sans maladie ou sans rechutes (selon l'indication de l'alloCH) pour le receveur, mais le risque de GvH aiguë et chronique est supérieur. Dans le cas de deux personnes non parentes, il semblerait que la survie globale et sans maladie soient similaires quelle que soit la technique de prélèvement, mais là encore le risque de GvH aiguë et chronique est supérieur pour une alloCH à partir de sang périphérique (Cheuk, 2013).

Conditionnement

Le conditionnement sert à éliminer tout ou partie des CH du receveur dans le but de supprimer des cellules malades, d'éviter le rejet du greffon par le système immunitaire du receveur et, bien que la nécessité en soit remise en question (Westerhuis et al., 2011), de rendre disponibles les niches à cellules souches hématopoïétiques pour l'« installation » des CH du donneur. Ordinairement, le receveur reçoit un régime myéloablatif par chimiothérapie et radiothérapie. C'est le traitement le plus puissant quant au contrôle de la maladie. Afin de réduire les complications du conditionnement (Mohty et al., 2015), plusieurs pistes sont explorées. La radiothérapie pourrait être supprimée sans grever l'efficacité de la greffe (Copelan et al., 2013; Nagler et al., 2013). Les médicaments de la chimiothérapie myéloablative sont reconsidérés.

Pour étendre le recours à l'alloCH à des patients présentant un profil délicat (âgés, sujets à d'autres pathologies), qui supporteraient difficilement un régime myéloablatif, des conditionnements partiellement ou non myéloablatifs ont été mis au point (Sorrer et al., 2005). Ils réduisent la toxicité aiguë de l'alloCH. L'effet sur la toxicité chronique est plus difficile à évaluer. Enfin, il semblerait,

comme il était prévisible (voir le paragraphe ci-dessous), qu'ils laissent davantage la possibilité à des rechutes.

Prise de greffe et chimérisme

L'« installation » (ou *homing*) des CH greffées dans la MO a lieu dans les heures suivant l'alloCH. Mais leur localisation dans les niches à cellules souches hématopoïétiques et leur activité d'hématopoïèse desquelles découle la repopulation du sang du receveur mettent au moins deux semaines à démarrer (Cutler and Antin, 2001). C'est pourquoi la cytopénie dont le conditionnement fait souffrir le patient est prolongée. Certains médicaments du traitement prophylactique de la GvH comme le méthotrexate (voir ci-dessous) l'entretiennent en détruisant les cellules à renouvellement rapide.

En transplantation, le chimérisme est un concept traduisant la présence chez le receveur de CH du donneur ; il est complet quand toutes les cellules sanguines du receveur proviennent du donneur. Dans l'alloCH, il dépend de l'efficacité du régime myéloablatif et de l'activité des lymphocytes T et *natural killer* (NK) du greffon à éliminer les cellules hématopoïétiques résiduelles, notamment malignes, de l'hôte (effet GvL pour : *graft-versus-leukemia* en anglais). Dans un état de chimérisme incomplet, les cellules résiduelles provenant du receveur risquent de refaire surface, donnant lieu à une rechute de la maladie initiale (Khan et al., 2004).

Concernant la fonction immunitaire « classique » (lutte anti-infectieuse...), il faut en général attendre quelques semaines à quelques mois avant que le greffon n'en rétablisse une normale chez le receveur (Barrett et al., 2003).

Le recouvrement de l'immunité après alloCH est évidemment primordial, puisqu'il conditionne des fonctions aussi essentielles que la lutte contre les infections et les tumeurs et prévient le risque de rechutes de la maladie qui a nécessité l'alloCH. Il procède essentiellement des cellules immunitaires issues du greffon. Cependant, celles-ci peuvent aussi déclencher un phénomène pathologique en reconnaissant le receveur comme étranger : la GvH (voir ci-dessous).

La greffe peut rencontrer des difficultés immédiates ou tardives à « prendre ». Il peut s'agir d'un rejet de la greffe par l'immunité résiduelle du receveur, ou d'un échec de la greffe, au mécanisme

non immunitaire obscur. Ce phénomène, dépendant notamment de l'efficacité du conditionnement, est plus rare que la GvH.

Le désordre fait la servitude

Charles Péguy

B) La maladie du greffon contre l'hôte, fruit du désordre

L'histocompatibilité

Le système *human leukocyte antigens* (HLA) est le système génétique codant pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), hétérodimères transmembranaires exposant des peptides aux lymphocytes T. Ces peptides sont issus de la dégradation intracellulaire de protéines. Les molécules du CMH de classe I sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées et des plaquettes et exposent aux lymphocytes T CD8 (cytotoxiques) des peptides antigéniques provenant du secteur intracellulaire (ou parfois du secteur extracellulaire si la cellule est une cellule présentatrice de l'antigène [CPA], on parle alors de présentation croisée). Les molécules du CMH de classe II sont exprimées à la surface des CPA et exposent aux lymphocytes T CD4 (auxiliaires) des antigènes provenant du secteur extracellulaire. Tandis que la liaison du CMH I (ou II) au CD8 (ou CD4) du lymphocyte T stabilise la synapse immunitaire, le peptide présenté se lie au récepteur du lymphocyte T (TCR).

Après alloCH, des CPA résiduelles du receveur peuvent interagir avec des lymphocytes T du donneur : c'est une réaction allogénique, ou alloréaction (Shlomchik et al., 1999). Les molécules du CMH présentant des régions variables, les lymphocytes T du donneur, *via* leur TCR, peuvent les reconnaître comme étrangères et s'activer. Ces régions variables représentent les antigènes majeurs d'histocompatibilité. En outre, les peptides présentés dans le contexte des molécules du CMH, s'ils sont issus de protéines endogènes à fort polymorphisme génétique, peuvent aussi activer les lymphocytes T dans l'alloréaction. Il s'agit des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA). La présentation peut aussi être indirecte : les CPA du donneur sont capables de prendre en charge des miHA du receveur et de les présenter aux lymphocytes T du donneur.

L'activation des lymphocytes T à la suite de l'alloréaction peut donner lieu à des dommages sévères, voire mortels (Figure 1). Ce phénomène pathologique, appelé GvH, peut être vu comme un effet indésirable de l'alloCH. Dans le cas d'une alloCH entre individus dont les HLA sont compatibles, les lymphocytes T du donneur peuvent tout de même être activés, mais de façon moins conséquente, par les miHA. Ce serait la raison pour laquelle, par exemple, les receveurs masculins, dont le chromosome Y code pour des miHA (Spierings and Goulmy, 2005), sont plus enclins à développer une GvH lorsque greffés par des CH de donneuses (Randolph et al., 2004). Bien que les pratiques récentes dans l'alloCH en diminuent l'importance (Kanda et al., 2014), le choix du donneur reste donc crucial pour la bonne tolérance du greffon vis-à-vis du receveur et vice-versa. Il s'agit de satisfaire à la plus haute identité génétique entre receveur et donneur, notamment concernant les loci HLA A, B, C et DRB1 (Welniak et al., 2007). Étant donné que l'haplotype HLA (ensemble des gènes présents sur un chromosome) est transmis en bloc, deux frères ou sœurs ont statistiquement une chance sur quatre de posséder le même HLA. Statistiquement, un individu a 30 % de chances d'avoir un frère ou une sœur histocompatible (Ballen et al., 2008), c'est-à-dire dont les deux allèles des gènes HLA A, B, C et DRB1 sont identiques. Parmi tous les donneurs volontaires de CH, il arrive aussi de trouver quelqu'un d'histocompatible avec le receveur. Sinon, il est possible d'envisager une alloCH avec un donneur qui n'est pas parfaitement histocompatible (Kekre and Antin, 2014).

Le typage HLA est aujourd'hui réalisé par des techniques de biologie moléculaire couplée à des essais Luminex.

Par ailleurs, des études soulignent l'utilité du typage du receveur sur des gènes polymorphiques codant pour des cytokines, des récepteurs aux cytokines, aux signaux de danger, des enzymes métabolisant des substances actives administrées en prophylaxie, et autres protéines impliquées dans la physiopathologie de la GvH (voir ci-dessous) (Mosaad, 2014). Dans l'alloCH comme dans d'autres techniques médicales, l'avenir paraît à l'individualisation des protocoles.

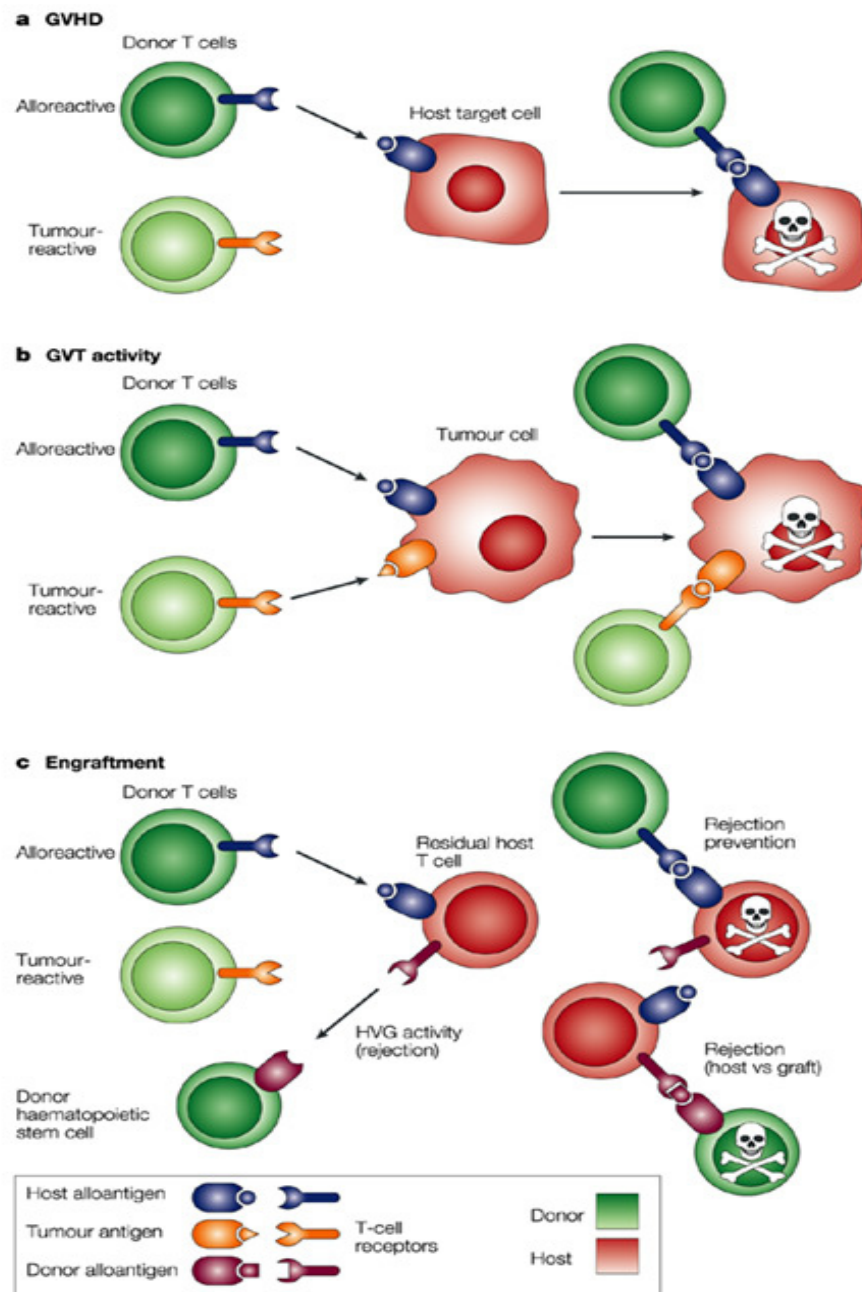


Figure 1 : Alloréactions possibles après l'allogreffe de cellules hématopoïétiques.

D'après (van den Brink and Burakoff, 2002). Alloréactions engagées dans **A** la GvH, **B** l'effet GvL et **C** la prise de greffe (prévention du rejet du greffon par le receveur en haut et rejet du greffon par le receveur en bas).

Épidémiologie

C'est en général après alloCH que survient la GvH, mais elle est possible après toute greffe ou transplantation contenant des lymphocytes T, transfusion sanguine comprise, si le patient n'est pas en mesure d'éliminer ces cellules.

On distingue les GvH en GvH aiguës et GvH chroniques selon la durée après laquelle elles se déclarent et leur tableau clinique (voir ci-dessous). Les phénomènes immunobiologiques qui sous-tendent les deux catégories de GvH sont différents, bien qu'il s'agisse dans les deux cas d'une réponse immunitaire du greffon contre l'hôte. Conventionnellement, on estime qu'une GvH qui se déclare plus de cent jours après l'alloCH est chronique, mais lorsque le tableau clinique est plus proche de la GvH aiguë, on parlera de GvH aiguë d'apparition tardive (Socie and Ritz, 2014).

En prenant en compte les GvH aiguës d'apparition tardive, l'incidence de la GvH aiguë après alloCH atteint 80 % des patients (Flowers et al., 2011). Elle est la cause d'environ 15 % des décès après alloCH, derrière la rechute de la maladie (environ 40 %) et une infection (environ 20 %) d'après le *Center for international Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR).

Physiopathologie de la GvH aiguë

Les signaux de danger et les cytokines jouent un rôle complémentaire aux disparités HLA dans la phase d'initiation de la GvH aiguë. Les signaux de danger peuvent provenir de l'organisme (DAMP : *damage-associated molecular pattern*, encore nommés alarmines) ou du microbiote intestinal (PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*). La plupart des DAMP sont des molécules intracellulaires sécrétées ou libérées par des cellules stressées ou en train de mourir, comme les protéines de choc thermique (HSP), l'adénosine triphosphate (ATP), l'acide urique... Leur présence extracellulaire témoigne du danger qui a causé le stress ou la lyse de la cellule. Les DAMP, *via* certains récepteurs *Toll-like* (TLR) par exemple, activent les cellules de l'immunité, innée et adaptative, donnant lieu à une réponse immunitaire (sécrétion de cytokines inflammatoires, activation des CPA...) censée combattre le danger en présence (Matzinger, 2002). Dans l'alloCH, le régime de conditionnement à la greffe cause la libération massive de DAMP, qui fait le lit de la GvH en exacerbant la réponse immunitaire engagée par la reconnaissance des tissus du receveur comme

étrangers. Les PAMP aussi. Lipopolysaccharides et autres molécules microbiologiques, leur libération systémique découle des dommages gastro-intestinaux (et, dans une moindre mesure, cutanés) dus au conditionnement à l'alloCH (Hill et al., 1997). Dans ces conditions, les signaux de danger et les cytokines inflammatoires sont massivement produits et mènent à une activation immunitaire très forte. Le phénomène s'entretient ensuite par la libération de DAMP et de PAMP dus aux dégâts tissulaires engendrés par la GvH (Zeiser et al., 2011). Les cytokines sécrétées peuvent elles-mêmes conduire directement à des dommages cellulaires, tel le facteur de nécrose tumorale (TNF) α , cytokine centrale de la GvH (Piguet et al., 1987), capable entre autres de générer des radicaux oxygénés (Morgan et al., 2008). Des expériences dans un modèle murin de GvH avec des souris déficientes pour une cytokine ou un récepteur à un DAMP (tantôt les receveuses, tantôt les donneuses) ont souligné le rôle primordial que signaux de danger et cytokines jouent dans la GvH. En effet, des expériences menées sur l'interféron γ (Jaspersen et al., 2009) et le récepteur P2X₇R à l'ATP (Wilhelm et al., 2010) ont souligné leur implication dans la sévérité de la GvH ; des expériences sur l'IL-10 (Rowe et al., 2006) son rôle dans l'atténuation de la GvH ; et des expériences sur l'IL-22 (Couturier et al., 2013; Hanash et al., 2012) son rôle dans la sévérité ou l'atténuation selon la source d'IL-22 et le site de sécrétion.

Canoniquement, c'est la stimulation des lymphocytes T du donneur par les CPA résiduelles de l'hôte qui provoque la GvH (Shlomchik et al., 1999) (Figure 2). Quoique beaucoup moins puissamment, les CPA du donneur en sont aussi capables, *via* les molécules du CMH (Koyama et al., 2012). Chez l'animal, des expériences de déplétion de différentes sous-populations de CPA ont été menées sans parvenir à inhiber la GvH, suggérant une redondance entre elles dans ce contexte (Li et al., 2012). D'après un article récent, les CPA non hématopoïétiques seraient suffisantes à induire la GvH aiguë (Koyama et al., 2012). Le tractus gastro-intestinal est doté de CPA non hématopoïétiques mésenchymateuses, et ses cellules épithéliales sont capables d'exprimer les molécules du CMH de classe II dans un contexte inflammatoire (Hershberg et al., 1997) : c'est ce qui pourrait en faire un organe crucial dans le développement de la GvH.

Exprimant des antigènes du non-soi (le receveur) et un haut niveau de molécules de costimulation (Dustin, 2001), les CPA stimulent donc les lymphocytes T du donneur. L'alloréaction initiale a lieu : soit *in situ*, après activation par l'irradiation, de façon indépendante des antigènes, des

lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes secondaires, et migration vers les cellules épithéliales de l'intestin exprimant le CMH de classe II (Koyama et al., 2012) ; soit dans des organes lymphoïdes secondaires ; les cellules effectrices migrent ensuite vers les tissus enflammés sous l'influence des chimiokines (Chakraverty et al., 2006; Kittan and Hildebrandt, 2010). Les premiers lymphocytes T qui s'activent ne peuvent être que des lymphocytes T matures au moment de l'allogreffe, car ceux produits par lymphopoïèse après greffe sont éduqués dans le thymus du receveur. La phase effectrice de la GvH traduit l'action prédominante des lymphocytes T CD8. D'autres cellules effectrices entrent en jeu, à l'impact encore flou : les polynucléaires neutrophiles pourraient accentuer les dégâts causés par les lymphocytes T cytotoxiques ; les lymphocytes NK et B et les macrophages le pourraient aussi, ou bien les limiter au contraire (Holtan et al., 2014). Quant aux lymphocytes T mémoire, ils seraient incapables de déclencher une GvH aiguë sévère (Chen et al., 2007) mais perpétueraient une GvH existante (Miller et al., 2010).

Physiologiquement, la tolérance d'une alloCH et la non-survenue d'une GvH tiennent à l'activité de cellules immunomodulatrices en présence. En particulier, on découvre que les cellules NKT du receveur jouent un rôle prépondérant, parce qu'elles stimulent les lymphocytes T régulateurs (Treg) du receveur et du donneur (Chaidos et al., 2012; Hongo et al., 2012; Pillai et al., 2009; Rubio et al., 2012).

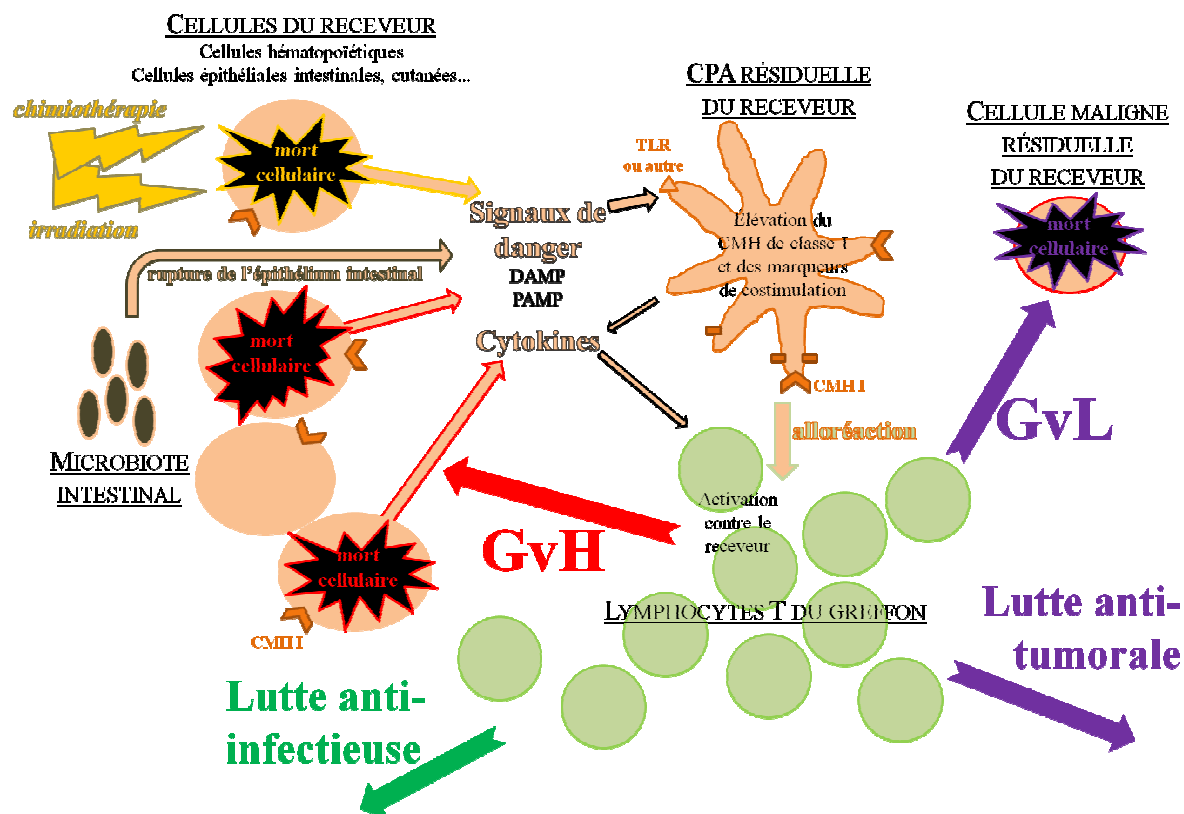


Figure 2 : Physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte.

La chimiothérapie et l'irradiation composent le régime du conditionnement à l'alloCH. Le conditionnement provoque la libération massive de signaux de danger activant les CPA résiduelles du receveur ; après alloCH, celles-ci stimulent les lymphocytes T matures du donneur, lesquels se dirigent alors contre les tissus du receveur, entraînant encore la libération de signaux de danger et de cytokines. La CPA du receveur peut être d'origine hématopoïétique ou non ; plus rarement, elle peut être une CPA d'origine hématopoïétique du donneur. Les lymphocytes T assurent d'autre part des fonctions bénéfiques chez le receveur (effet GvL, luttés anti-tumorale et anti-infectieuse).

CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; DAMP et PAMP : *damage et pathogen-associated molecular patterns* ; GvH : maladie du greffon contre l'hôte ; GvL : *graft-versus-leukemia* ; TLR : récepteur *Toll-like*.

Microbiotes intestinal et cutané et maladie du greffon contre l'hôte

Des souris élevées en conditions stériles développent une GvH retardée (van Bakkum and Knaan, 1977). Chez la souris, un traitement par un antagoniste du LPS atténue la GvH sans amoindrir

l'effet GvL (Cooke et al., 2001). Les patients placés dans un environnement pauvre en bactéries risquent moins de développer une GvH (Storb et al., 1983). Ces constats soulignent deux faits : une infection concomitante à l'alloCH, favorisée par la cytopénie consécutive et l'immunosuppression de la prophylaxie, concourt à l'apparition d'une GvH aiguë. Par exemple, les infections à cytomégalovirus (réactivations) ou à *Clostridium difficile* (Tuncer et al., 2012) sont courantes après alloCH et, pour le cas de la bactériose, corrélient souvent avec une GvH d'atteinte intestinale (Alonso et al., 2012). De même, forte est l'influence des PAMP et des bactéries libérés du microbiote intestinal (et, dans une moindre mesure, du microbiote cutané) dans la circulation générale après endommagement des barrières épithéliales correspondantes. Il a par exemple été montré qu'une bactériémie précoce augmente le risque de survenue d'une GvH aiguë (Poutsika et al., 2011).

De surcroît, les cellules de Paneth (présentes dans la niche de cellules souches intestinales), qui produisent des signaux essentiels pour les cellules souches intestinales, au rôle bénéfique dans la GvH (Takashima et al., 2011), et libèrent des α -défensines, peptides antimicrobiens, sont lésées par la GvH (Eriguchi et al., 2012). La destruction de ces cellules qui, physiologiquement, contribuent à la coexistence harmonieuse de l'organisme et son microbiote, cause une recrudescence de l'invasion de PAMP, aggravant encore la maladie (Levine et al., 2013).

Enfin, renforçant l'idée que l'intestin est un site crucial dans la GvH, l'inhibition de la migration des lymphocytes T vers l'intestin par déficience en l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ (ou *lymphocyte Peyer patch adhesion molecule*) réduit la GvH (Waldman et al., 2006).

Des stratégies de décontamination du tractus gastro-intestinal et d'inhibition des TLR sont explorées afin de limiter l'apparition et la sévérité de la GvH (Fuji et al., 2014).

Manifestations cliniques

Les organes couramment touchés par la GvH (aiguë et chronique) sont : la peau, l'intestin, le foie, les poumons, l'œil, la cavité orale et la cavité génitale de la femme. Ils sont pour la plupart en contact avec le monde extérieur. La GvH est une maladie systémique ; mais selon l'organe qu'elle endommage, on parlera de GvH cutanée, intestinale, hépatique, oculaire... Plusieurs organes peuvent être le site de dégâts de la GvH, de façon concomitante ou différée.

Dans la GvH aiguë, les plus souvent affectés se résument à la peau, au tractus gastro-intestinal et au foie (Martin et al., 1990). La peau est la plus touchée, et souvent en premier. Hormis le cuir chevelu, toute la peau peut présenter une éruption maculo-papuleuse pouvant atteindre l'ulcération. Des troubles digestifs témoignent d'une GvH intestinale, au premier rang desquels la diarrhée. Du sang peut être retrouvé dans les selles, signe de lésions intestinales de mauvais pronostic. Le syndrome de la GvH hépatique (ictère...) est difficile à distinguer d'autres troubles hépatiques (Ferrara et al., 2009).

Diagnostic

Le diagnostic de la GvH est difficile parce que d'autres pathologies favorisées par l'alloCH peuvent produire des manifestations similaires (GvH intestinale et colite infectieuse, GvH hépatique et toxicité hépatique du traitement prophylactique...). Il repose principalement sur l'examen clinique et histologique. Les symptômes, abordés plus haut, ne sont pas spécifiques et le diagnostic procède par élimination d'autres causes possibles.

Le diagnostic histologique est important. Sur des biopsies de peau, l'apoptose à la base de l'épiderme est caractéristique, de façon analogue à la présence de corps apoptotiques à la base des cryptes intestinales. La biopsie hépatique, très invasive, est rarement effectuée, faisant de la GvH hépatique, avec le manque de spécificité des signes cliniques, un diagnostic d'exclusion.

L'imagerie peut être utile, notamment pour compléter le diagnostic de l'atteinte intestinale (Malard and Mohty, 2014).

Un grave handicap dans la prise en charge de la GvH est qu'actuellement aucun biomarqueur prédictif de la survenue de la maladie, de la réponse au traitement ou de la survie du patient n'est disponible en routine au laboratoire d'analyses (Paczesny, 2013). Étant donné la ressemblance de la GvH avec d'autres pathologies, un panel de plusieurs biomarqueurs paraît requis. Nombreux sont les candidats à avoir été identifiés. Le potentiel de la plupart des molécules impliquées dans la physiopathologie est examiné. Elles pourraient être dosées dans le sérum par des techniques immunologiques ou par spectrométrie de masse. Par protéomique, Paczesny et ses collaborateurs ont identifié quatre biomarqueurs augmentés dans le sérum de patients développant la GvH : CD25 (sous-

unité α du récepteur à l'IL-2), le récepteur 1 du TNF α , l'IL-8 et le facteur de croissance des hépatocytes (Paczesny et al., 2009b). La même équipe a montré que l'augmentation de REG-3 α (*regenerating islet-derived 3 α*) sérique marque une GvH intestinale (Ferrara et al., 2011). D'autre part, la céruloplasmine a été proposée comme biomarqueur précoce de la GvH sans discrimination de l'organe principalement atteint (Lv et al., 2013). Pour le futur, Paczesny (Paczesny, 2013) recommande d'explorer trois pistes : l'analyse des miRNA (Ranganathan et al., 2012), des populations lymphocytaires T (notamment Treg) (Magenau et al., 2010) et des profils protéiques (protéomique), cette dernière paraissant particulièrement pertinente (Mann and Jensen, 2003). L'analyse de la concentration sérique des PAMP et des DAMP, qui peuvent d'ailleurs provenir spécifiquement d'un organe, est aussi prometteuse (Ramadan and Paczesny, 2015).

Évaluation de la gravité de la maladie

En 1994, le consensus de Keystone (Przepiorka et al., 1995) proposa une évaluation de la gravité de la GvH aiguë (Tableau I), généralement utilisée dans le monde (Bolanos-Meade and Vogelsang, 2004). Par défaut de clarté et de pragmatisme, elle ne concorde pas toujours d'un centre à l'autre. Plusieurs équipes ont récemment proposé des ajustements pour redéfinir plus objectivement certains critères de cette évaluation (Goyal et al., 2015; Levine et al., 2014).

Tableau I : Évaluation du grade de la maladie selon le consensus de Keystone.

D'après (Bolanos-Meade and Vogelsang, 2004). Pour l'enfant, la diarrhée est à calculer selon sa surface corporelle. Le stade de GvH intestinale et hépatique est à diminuer de 1 si une autre cause (une infection par exemple) est susceptible de provoquer les symptômes.

	Organe affecté		
	Peau	Intestin	Foie
Stade			
1	Éruption de moins de 20 % de la surface totale de la peau	Diarrhée de plus de 500 ml/j ou nausée persistante avec indice histologique	Bilirubine totale entre 20 et 30 mg/l
2	Éruption de plus de 20 % de la surface totale de la peau	Diarrhée de plus de 1000 ml/j	Bilirubine totale entre 30 et 60 mg/l
3	Éruption de plus de 50 % de la surface totale de la peau	Diarrhée de plus de 1500 ml/j	Bilirubine totale entre 60 et 150 mg/l
4	Érythroderme généralisé avec formation bulleuses	Douleur abdominale sévère	Bilirubine totale supérieure à 150 mg/l
Grade global de la maladie			
I	Stade 1 ou 2		
II	Stade 3 ou	Stade 1 ou	Stade 1
III		Stade 2 ou 3 ou	Stade 2, 3 ou 4
IV	Stade 4 ou	Stade 4	

Enjeu du traitement prophylactique : le moindre mal

Après l'alloCH, bien que des cellules immunitaires résiduelles du receveur subsistent, le système immunitaire du receveur ressortit essentiellement des cellules provenant du donneur. L'objectif principal du traitement prophylactique est d'éviter la GvH, c'est-à-dire empêcher

l'activation du système immunitaire venant du donneur, en particulier de ses lymphocytes T, envers les tissus du receveur.

Le traitement prophylactique est composé d'immunosuppresseurs (Tableau II). Il comprend en général un inhibiteur de la calcineurine, tacrolimus ou ciclosporine (Ruutu et al., 2014). La calcineurine induit la translocation nucléaire de facteurs nucléaires des lymphocytes T activés (dont NFAT) en les déphosphorylant ; ses inhibiteurs empêchent donc l'activation massive des lymphocytes T. Pour une meilleure efficacité, la ciclosporine ou le tacrolimus sont associés au méthotrexate (Storb et al., 1986) à faible dose (Przepiorka et al., 1996), ou, dans certains cas, au mycophénolate mofétil (Brunstein et al., 2007).

Outre ses effets indésirables comme la toxicité rénale, hépatique ou l'hypertension, cette prophylaxie nécessaire comporte des risques graves. Les lymphocytes T du greffon complètent le conditionnement en supprimant les cellules malignes résiduelles (effet GvL), en plus de leurs fonctions immunitaires classiques. Inhiber les lymphocytes T ne fait pas que diminuer le risque de destruction des tissus du receveur, mais aussi favorise l'échec de la prise de greffe, les rechutes, les infections potentiellement mortelles et, à long terme, les cancers. Le défi est de concevoir un traitement prophylactique qui réduise au maximum tous ces risques, sachant que souvent les leviers connus à ce jour réussissent à en diminuer un au prix d'en augmenter un autre.

Malgré les risques énoncés (risque de rechute, infectieux, tumoral), la déplétion des lymphocytes T *ex vivo* et *in vivo* a été étudiée. L'effet d'immunosuppresseurs inhibant spécifiquement ou non, et directement ou non les lymphocytes T (globulines anti-thymocytes, cyclophosphamide, sirolimus...), en association avec un inhibiteur de la calcineurine et/ou le méthotrexate, a été examiné notamment pour les greffes entre personnes non parentes, plus sujettes à la GvH. Les résultats sont parfois encourageants et continuent d'être étudiés (Choi and Reddy, 2014). Il en est de même pour des antagonistes de cytokines telles l'interleukine (IL)-6 ou le TNF α (Choi and Reddy, 2014; Magenau and Reddy, 2014). Il est possible de dépler *ex vivo* le greffon de ses lymphocytes T par reconnaissance de CD25, récepteur à l'IL-2, et d'injecter quelques semaines après l'alloCH les lymphocytes T si le receveur montre des signes favorables : ainsi, la sécurité et l'efficacité de l'opération seraient mieux assurées (Solomon et al., 2005).

Des chercheurs ont élaboré une stratégie ingénieuse : transfecter dans les lymphocytes T du greffon un gène responsable de la synthèse de la thymidine kinase du virus *Herpes simplex* de façon à pouvoir les déplerer par administration de ganciclovir à l'apparition de symptômes de la GvH. Les résultats de cette stratégie d'apoptose inductible chez quelques patients ont été très encourageants (Tiberghien et al., 2001). De façon similaire, une autre équipe a transfecté dans les lymphocytes T du greffon un gène responsable de la synthèse d'une protéine de fusion qui, réagissant à une molécule de synthèse, conduit à la mort de la cellule. Encore une fois, aux premiers symptômes de la GvH, la molécule de synthèse a été administrée ; 90 % des lymphocytes T allogéniques sont morts dans les 30 min et la GvH a régressé et n'est pas réapparue (Di Stasi et al., 2011).

L'injection de Treg, qui favorisent la tolérance immunitaire, améliorerait la prise de greffe et modérerait la sévérité de la GvH sans entraver l'effet GvL, mais affaiblirait le receveur devant les infections (Di Ianni et al., 2011; Edinger et al., 2003). Cependant, la technique de préparation des Treg est compliquée. Sans devoir en préparer, l'influence des Treg dans le sang périphérique peut être accentuée par un traitement au long cours par l'IL-2 à faible dose (Koreth et al., 2011). Les cellules souches mésenchymateuses aussi ont un pouvoir immunomodulateur ; leur emploi avec l'alloCH a donné des résultats mitigés (Ning et al., 2008). L'injection de cellules NKT invariante du donneur, dont nous avons rappelé le pouvoir immunomodulateur, paraît plus prometteuse (Schneidawind et al., 2014).

Enfin, l'administration de modulateurs épigénétiques, aux effets immunomodulateurs, en association avec un inhibiteur de la calcineurine et le méthotrexate, a récemment montré des résultats encourageants (Choi et al., 2014; Goodyear et al., 2012).

La plupart de ces pistes sont actuellement investiguées à plus grande échelle et une amélioration probante de la prophylaxie de la GvH sans aggravation des autres enjeux de l'alloCH est espérée.

Le traitement après l'alloCH comprend aussi la prise en charge prophylactique (et curative, le cas échéant) des infections susceptibles de survenir à cause, d'abord du conditionnement myéloablatif, ensuite de la prophylaxie immunosuppressive, ainsi que des autres effets indésirables de ces derniers (Ferrara et al., 2009).

Tableau II : Médicaments employés ou envisagés dans la prise en charge de la GvH.

D'après (Choi and Reddy, 2014; Magenau and Reddy, 2014; Paczesny et al., 2009a). Ne sont pas abordées dans ce tableau l'injection de Treg, les autres stratégies cellulaires, ni la photophérèse.

P : prophylaxie (de première intention) ; TPI : traitement de première intention ; TGC : traitement de la GvH cortico-résistante ; EP : envisagé dans la prophylaxie ; ETPI : envisagé dans le traitement de première intention ; ETGC : envisagé dans le traitement de la GvH cortico-résistante.

Substance active	Mécanisme d'action (brièvement)	Effet	Indication
Tacrolimus	Inhibiteur de la calcineurine	Inhibition de la transcription d'IL-2, d'où une inhibition de l'activation des lymphocytes T	P
Ciclosporine	Inhibiteur de la calcineurine	Inhibition de la transcription d'IL-2, d'où une inhibition de l'activation des lymphocytes T	P
Méthotrexate	Anti-métabolite (inhibiteur de la réductase du dihydrofolate)	Immunosuppression globale	P en association avec un inhibiteur de la calcineurine.
Mycophénolate mofétil	Anti-métabolite (inhibiteur de la déshydrogénase du monophosphate d'inosine)	Immunosuppression globale par inhibition de la synthèse de purines <i>de novo</i>	P en association avec un inhibiteur de la calcineurine pour une alloCH conditionnée par un régime peu ou non myéloablatif. ETGC
Globulines anti-thymocyte	Anticorps polyclonaux cytotoxiques anti-thymocyte	Déplétion des lymphocytes T	EP TGC
Étanercept	Antagoniste du TNF α (récepteur soluble)	Immunosuppression par leurre du TNF α	EP TGC ETPI en association avec un corticoïde
Divers	Glucocorticoïdes	Effet anti-inflammatoire, immunosuppression globale	TPI
Alemtuzumab	Anticorps monoclonal cytotoxique anti-CD52	Déplétion des lymphocytes T et B principalement	EP TGC
Sirolimus (rapamycine)	Inhibiteur du <i>mammalian target of rapamycine</i>	Inhibition de la signalisation de l'IL-2, d'où une inhibition de l'activation des lymphocytes T	EP TGC

(mTOR)		et B	
Abatacept	Antagoniste du CD28	Inhibition de l'activation des lymphocytes T par inhibition des signaux de costimulation	EP
Cyclo-phosphamide	Agent alkylant	Immunosuppression globale	EP
Pentostatine	Inhibiteur de la désaminase de l'adénosine	Immunosuppression en particulier des lymphocytes T	EP ETGC
Rituximab	Anticorps monoclonal cytotoxique anti-CD20	Déplétion des lymphocytes B	EP
Maraviroc	Antagoniste du récepteur aux chimiokines de type 5	Inhibition des leucocytes	EP
Infliximab	Anticorps monoclonal anti-TNF α	Immunosuppression	EP (mais résultats peu probants)
Daclizumab	Anticorps monoclonal anti-CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2)	Inhibition de l'activation des lymphocytes T	EP
Basiliximab	Anticorps monoclonal anti-CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2)	Inhibition de l'activation des lymphocytes T	EP
Tocilizumab	Inhibiteur de l'IL-6	Immunosuppression	EP
Atorvastatine	Statine	Immunomodulation	EP
Bortézomib	Inhibiteur du protéasome	Immunosuppression par augmentation de l'apoptose	EP
Vorinostat	Inhibiteur de la désacétylase de l'histone	Immunomodulation par inhibition de signal transducteur et activateur (STAT) 3	EP
Azacitidine	Agent hypométhylant	Immunomodulation	EP
Divers	Bactériostatiques	Immunomodulation par inhibition de la libération de PAMP	EP
α 1-antitrypsine	Inhibition de la libération de DAMP ?	Immunomodulation	ETGC

Traitement

La GvH cutanée de grade I est traitée par corticothérapie topique. Le traitement de première intention des autres formes de GvH aiguë est la corticothérapie à forte dose, orale ou intraveineuse. Pour en éviter les effets indésirables, les médecins diminuent petit à petit sa dose un certain temps (il

n'y a pas de consensus) après l'apparition de signes fiables de résolution de la GvH. Malheureusement la moitié des patients n'est pas très bon répondeur (MacMillan et al., 2002) ; or le pronostic est fortement aggravé en cas de cortico-résistance (Westin et al., 2011). C'est pourquoi les cliniciens sont très attentifs à la réponse de la maladie aux corticoïdes (Deeg, 2007). Les traitements de première intention associant corticoïdes et autres immunosuppresseurs n'ont pas montré de bénéfice. Les GvH cortico-résistantes ne font pas l'objet d'un traitement standard (Tableau II). En général, des globulines anti-thymocytes ou des antagonistes de TNF α sont employés. De nombreux autres immunosuppresseurs et immunomodulateurs testés en laboratoire sont des pistes d'étude (Magenau and Reddy, 2014; Paczesny et al., 2009a). La photophérèse extracorporelle, technique d'apoptose des leucocytes par rayonnement ultraviolet, après leur dérivation de la circulation générale et administration d'un intercalant réagissant au rayonnement, montrerait des résultats intéressants (Jagasia et al., 2013), ainsi que l'injection de cellules mésenchymateuses du donneur ou d'un autre donneur, au pouvoir immunomodulateur (Le Blanc et al., 2008).

Maladie du greffon contre l'hôte chronique

La GvH chronique apparaît plus tardivement et progressivement que la GvH aiguë. Celle-ci en est un facteur de risque important ; même résolue, elle peut être quiescente et évoluer vers une GvH chronique. La différence avec des formes tardives ou résurgentes de GvH aiguë est d'ailleurs ténue (Socie and Ritz, 2014). Un autre facteur de risque est l'âge avancé du receveur. La physiopathologie est moins connue que celle de la GvH aiguë ; les lymphocytes B et T y tiennent un rôle essentiel. L'expression de la GvH chronique a trait avec celle de l'auto-immunité. Elle peut affecter plus d'organes que la GvH aiguë. Le premier signe clinique est en général une atteinte de la muqueuse buccale (Ferrara et al., 2009). En cohérence avec la méconnaissance de la physiopathologie de la GvH chronique, son traitement n'est ni standardisé ni très efficace. Comme pour la GvH aiguë, la corticothérapie seule paraît préférable (Koc et al., 2002), et la photophérèse extracorporelle est prometteuse (Couriel et al., 2006).

Modèles au laboratoire

Le modèle murin est de loin le plus couramment utilisé pour étudier l'alloCH et la GvH. Le conditionnement consiste en une irradiation à dose létale, parfois fractionnée pour réduire les dommages intestinaux. En général, le greffon est constitué de MO dont les lymphocytes T ont été déplétés, et de lymphocytes T issus de la rate ou, moins souvent, des ganglions lymphatiques. Les CH servent à reconstituer l'hématopoïèse ; elles sont séparées de leurs lymphocytes T pour mieux contrôler le modèle. Les lymphocytes T sont responsables de la GvH et de l'effet GvL. Le groupe contrôle consiste en une greffe de MO seulement. Comme la MO contient environ 2 % de lymphocytes T matures (Zeng et al., 1999), si elle n'en est pas déplétée, ce groupe contrôle peut parfois conduire à la mort de la receveuse par GvH.

De très nombreux modèles existent, mettant en jeu des souches de souris plus ou moins histocompatibles, des doses d'irradiation différentes, une dose de cellules dans le greffon différente... Les modèles peuvent ainsi donner lieu à des GvH de physiopathologies diverses. Selon l'objectif des recherches, on optera pour tel ou tel modèle (Schroeder and DiPersio, 2011). Le plus courant pour étudier la clinique de la GvH aiguë fait intervenir des souris C57BL/6 en tant que donneuses et des souris BALB/c en tant que receveuses, qui donne lieu rapidement et certainement à une maladie (Contassot et al., 1998).

II) Deux signaux de danger, et bien davantage

A) Les protéines de choc thermique

1) Vue d'ensemble

Des chaperons moléculaires

En 1962, Ferruccio Ritossa observe un renflement des chromosomes dans des cellules de glandes salivaires de drosophiles après incubation à une température fortuitement surélevée (Ritossa, 1996). L'expression protéique de cette thermorésistance est mise au jour douze ans plus tard (Tissières et al., 1974). Les protéines sont baptisées « de choc thermique » ; au vrai, elles se chargent de la résistance des cellules à des stress très divers qui les agressent en permanence : choc thermique mais aussi action d'un agent oxydant, radiation ultraviolette, hypoxie, hypoglycémie, action d'un anticancéreux... C'est pourquoi elles sont aussi dénommées « protéines de stress », maintenant.

Les HSP sont spectaculairement conservées à travers l'évolution. Par exemple, le gène codant pour HSP70 est identique à 50 % entre *Escherichia coli* et *Homo sapiens* (Hunt and Morimoto, 1985). À l'état basal, elles comptent pour 2 à 3 % des protéines cellulaires totales, ce qui témoigne de leurs rôles constitutifs ; ce rapport s'élève beaucoup en cas de stress, par l'intervention de leurs facteurs de transcription. Afin d'éviter une réponse au stress excessive, l'action de ces derniers est tempérée par les HSP elles-mêmes (Shi et al., 1998) et, pour l'*heat shock factor 1*, facteur de transcription majeur, par l'acétylation d'un résidu lysine diminuant leur affinité avec l'ADN des séquences promotrices (Westerheide et al., 2009).

Les HSP sont très nombreuses (voir ci-dessous). Elles diffèrent par leur localisation cellulaire, leur caractère constitutif ou inductible, leur fonction ATPasique ou non, leurs protéines clientes...

En situation de stress, elles s'adaptent pour accomplir à plus haut régime leurs fonctions physiologiques de chaperons moléculaires. Cela consiste à assurer la conformation tridimensionnelle des protéines en participant à leur bon repliement et leur stabilisation, contribuer à la formation d'oligomères, intervenir dans leur transport vers les divers organites et, si nécessaire, les orienter vers

une voie de dégradation (Gething and Sambrook, 1992). La Figure 3 montre le fonctionnement des HSP en situation de stress.

La protection que les HSP assurent contre les stress peut conduire à l'oncogenèse et à l'échec des agents anticancéreux (Joly et al., 2010; Mjahed et al., 2012). C'est pourquoi elles sont envisagées comme des cibles dans la thérapie anticancéreuse (Jego et al., 2013).

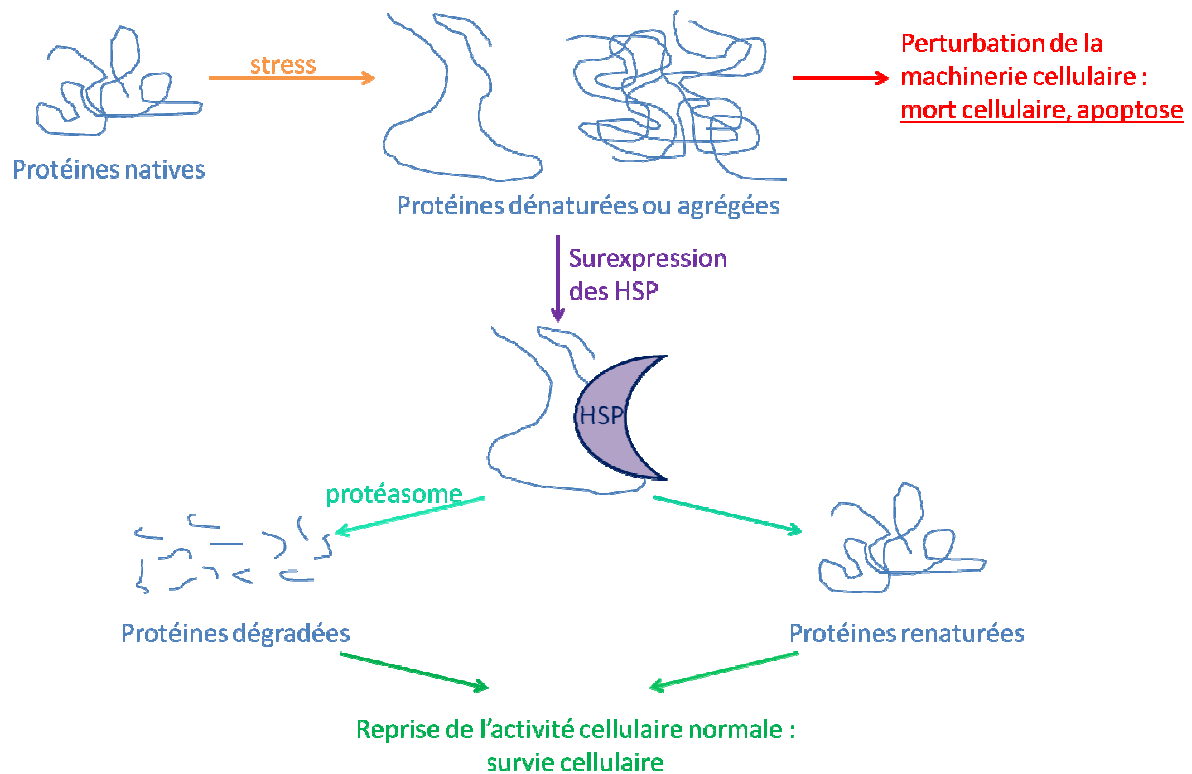


Figure 3 : Protection des protéines par les HSP dans la cellule soumise à un stress.

Un stress (choc thermique, agent oxydant...) endommage les protéines de la cellule, la menaçant de mort. Les HSP, surexprimées en recours, prennent en charge les protéines pour les renaturer ou contribuer à leur dégradation par le protéasome, permettant à la cellule de reprendre une activité normale.

Stress du réticulum endoplasmique

En cas de stress touchant particulièrement le RE (métabolisme altéré, perturbation de l'homéostasie calcique, privation de glucose...), les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, déclenchant la réponse aux protéines mal repliées (UPR, de l'anglais *unfolded protein response*)

(Rutkowski and Hegde, 2010). Elle consiste en l'activation de plusieurs protéines régulatrices entrant en relation avec l'appareil de Golgi et le noyau afin de surmonter ce stress (Figure 4), ou, à défaut, de mener la cellule vers l'apoptose. Ces protéines, habituellement inactives car liées à BiP (*immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*), encore appelée *glucose-related protein* (Grp)78, ne le sont plus entièrement en cas d'accumulation de protéines mal repliées (Clarke et al., 2012). Trois voies découlent de cette perturbation. PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) peut alors s'homodimériser et s'autophosphoryler, ce qui conduit après phosphorylation d'une autre protéine à l'inhibition de la traduction des protéines. ATF6 (*activating transcription factor 6*) se translate vers l'appareil de Golgi où il est clivé ; le fragment de clivage migre alors dans le noyau, où il promeut la transcription de plusieurs protéines du RE, dont BiP et *X-box binding protein 1* (XBP1). De façon analogue à PERK, IRE-1 α (*inositol-requiring protein 1 α*) s'homodimérise, s'autophosphoryle et, ainsi, épisse l'ARN messager de XBP1. La protéine XBP1 épissée est un médiateur central de l'UPR : elle promeut à la fois la transcription de BiP, la glycoprotéine 96 (Gp96) et autres chaperons du RE, et, possiblement, celle des facteurs impliqués dans la voie de dégradation associée au RE (Farooqi et al., 2015; Kitamura, 2008).

L'UPR peut aussi favoriser l'apoptose, notamment par l'augmentation de la transcription de la protéine pro-apoptotique CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein*). Dans certaines conditions, la mort cellulaire à la suite d'un stress du RE libère des DAMP, provoquant l'activation et l'amplification des réponses immunitaires (Garg et al., 2013). Le mécanisme de la domination des voies apoptotiques sur les voies de la survie cellulaire ou vice-versa est méconnu ; il semblerait qu'un stress du RE prolongé atténue les signaux en faveur de la survie en faisant persister les signaux pro-apoptotiques (Lin et al., 2007).

Certaines cellules sont plus sensibles que d'autres au stress du RE. C'est par exemple le cas des cellules hautement sécrétoires, comme les cellules de Paneth (Kaser et al., 2010).

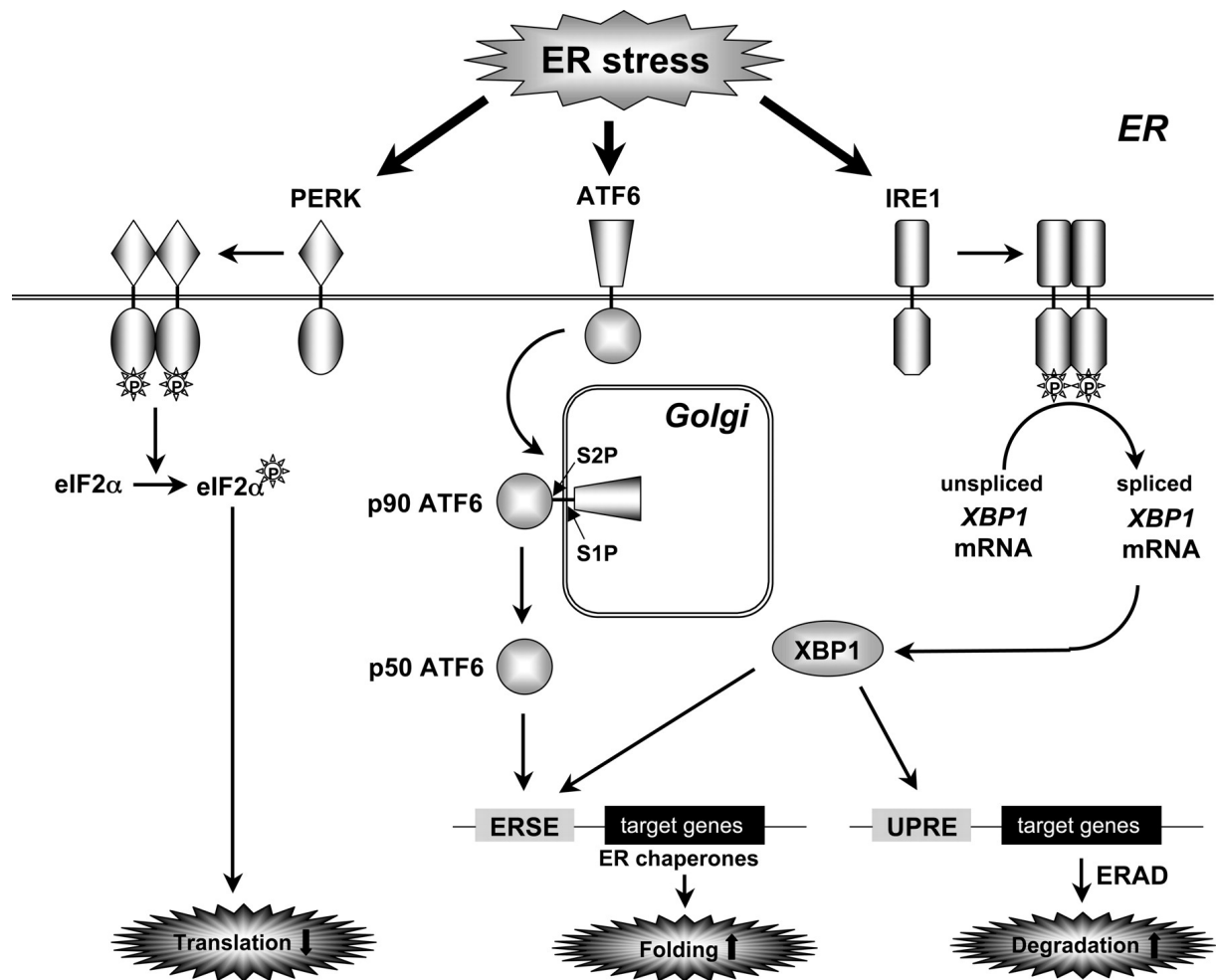


Figure 4 : Voies de réponse au stress du réticulum endoplasmique.

D'après (Kitamura, 2008). Un stress du RE induit une série de réponses moléculaires dirigées du RE vers l'appareil de Golgi et le noyau, orchestrant les modalités pour affronter ce stress et assurer la survie de la cellule. Dans certains cas au contraire, la réponse au stress du RE mène la cellule à l'apoptose.

ER : réticulum endoplasmique ; PERK : *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* ; ATF6 : *activating transcription factor 6* ; IRE-1 : *inositol-requiring protein 1* ; eIF-2α : *eukaryotic translation initiation factor 2α* ; S1P ou S2P : *site protease* ; XBP1 : *X-box binding protein 1* ; ERSE : élément de réponse au stress du RE ; UPRE : élément de réponse aux protéines mal repliées ; ERAD : dégradation associée au RE.

Classification

On classe les HSP des mammifères en six grandes familles selon leur masse moléculaire : les petites HSP, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP110. Entre habitudes et visions des choses, la nomenclature des protéines est très discutée et confuse, malgré une tentative récente de la fixer sur une base génétique (Kampinga et al., 2009), dont nous reproduisons une partie dans le Tableau III.

Tableau III : Nomenclature des familles HSP70 et HSP90.

D'après (Kampinga et al., 2009). La liste d'anciens noms n'est pas tout à fait exhaustive. Selon les auteurs, les noms s'écrivent tantôt en capitales d'imprimerie, tantôt en minuscules. Les noms soulignés sont ceux que nous utilisons dans ce travail pour les cinq protéines principalement étudiées. *En cours de discussion dans la communauté scientifique.

Nom du gène	Nom de la protéine	Anciens noms	ID du gène humain
Famille des HSP70 : HSPA			
<i>HSPA1</i>	HSPA1A	HSP70-1 ; HSP72 ; HSPA1	3303
<i>HSPA2</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304
<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	hum70t ; Hsp-hom	3305
<i>HSPA2</i>	HSPA2	Heat-shock 70kD protein-2	3306
<i>HSPA5</i>	HSPA5	<u>BiP</u> ; Grp78 ; MIF2	3309
<i>HSPA6</i>	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')	3310
<i>HSPA7</i>	HSPA7	Heat shock 70kD protein 7	3311
<i>HSPA8</i>	HSPA8	HSC70 ; HSC71 ; HSP71 ; HSP73	3312
<i>HSPA9</i>	HSPA9	Grp75 ; HSPA9B ; MOT ; MOT2 ; PBP74 ; mot-2	3313
<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	FLJ13874 ; KIAA0417	259217
<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1 ; 2700081N06Rik	116835
<i>HSPA13*</i>	HSPA13	Stch	6782
<i>HSPA14</i>	HSPA14	HSP70-4 ; HSP70L1 ; MGC131990	51182
Famille des HSP90 : HSPC			
<i>HSPC1*</i>	HSPC1	HSP90AA1 ; HSPN ; LAP2 ; HSP86 ; HSPC1 ; HSPC4 ; HSP89 ; HSP90 ; HSP90A ; HSP90N ; HSPCAL1 ; HSPCAL4 ; FLJ31884 ; <u>HSP90α1</u>	3320
<i>HSPC2*</i>	HSPC2	HSP90AA2 ; HSPCA ; HSPCAL3 ; HSP90 α ; <u>HSP90α2</u>	3324
<i>HSPC3*</i>	HSPC3	HSP90AB1 ; HSPC2 ; HSPCB ; D6S182 ; HSP90B ; FLJ26984 ; <u>HSP90β</u>	3326
<i>HSPC4*</i>	HSPC4	HSP90B1 ; ECGP ; <u>Gp96</u> ; Grp94 ; endoplasmine	7184
<i>HSPC5*</i>	HSPC5	TRAP1 ; HSP75 ; HSP90L	10131

2) La famille des HSP90

Structure des HSP90

Outre leur masse moléculaire, la structure des cinq membres des HSP90 est voisine. Elles comportent un site de dimérisation dans le domaine C-terminal, un domaine central qu'on pense impliqué dans la liaison aux protéines clientes, et un site de liaison à l'ATP dans le domaine N-terminal.

Une HSP90 relativement méconnue

La *TNF receptor-associated protein 1* (TRAP-1) est une HSP90 mitochondriale dont aucune protéine cliente n'est commune avec les HSP90 cytosoliques. Elle pourrait être en relation avec le stress du RE et régulerait l'apoptose en assurant une fonction antioxydante (Pridgeon et al., 2007).

Trois HSP90 très voisines

HSP90 α 1, HSP90 α 2 et HSP90 β sont les trois HSP90 cytosoliques. On confond souvent HSP90 α 1 et HSP90 α 2, qui sont toutes deux inductibles tandis que HSP90 β est constitutive ; celle-ci compte pour 1 % du total des protéines cytosoliques solubles, ce qui en fait la plus abondante (Csermely et al., 1998). De plus, on a souvent pris – et par commodité on continue de prendre – ces trois protéines pour une seule, qu'on appelle simplement HSP90. Leurs structures sont très proches et elles semblent accomplir des fonctions voisines. Elles agissent sous forme d'homodimères par interaction dans la région C-terminale ; l'existence *in vivo* d'hétérodimères entre elles est discutée (Minami et al., 1994).

Ces trois HSP90 interagissent avec une centaine de protéines clientes, notamment quelques-unes dont les rôles sont fondamentaux, comme celles du cytosquelette (Cambiagno et al., 1999) et du cycle cellulaire (Jerome et al., 1993). La Figure 5 présente le fonctionnement classique d'une HSP90 cytosolique ; cette activité est régulée positivement ou négativement par divers cochaperons.

Les HSP90 cytosoliques sont particulièrement impliqués dans les phénomènes d'oncogenèse (Joly et al., 2010) ; c'est pourquoi les inhibiteurs des HSP90 sont testés en études cliniques (Neckers

and Workman, 2012; Zagouri et al., 2013), notamment en phase III contre le cancer stromal gastro-intestinal (Biamonte et al., 2010). Les inhibiteurs des HSP90, tels la geldanamycine, le radicicol et la 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine (17AAG, encore appelé tanespimycine), fonctionnent spécifiquement en occupant le site de fixation à l'ATP, conservé entre toutes les HSP90 (Rosser et al., 2004). *In vivo*, ils sont rapidement dégradés en 17-amino-17-déméthoxygeldanamycine (17AG), un composé à l'activité similaire (Egorin et al., 1998). Ils traversent les membranes plasmiques par diffusion passive. Étant donné que les HSP90 (notamment les trois membres cytosoliques, voir ci-dessous) chaperonnent des protéines impliquées dans des phénomènes centraux, tels le cycle cellulaire et l'apoptose (Pelicano et al., 2006), les inhibiteurs des HSP90 ont été étudiés dans de nombreuses maladies, notamment les cancers (Hong et al., 2013).

Des localisations membranaire et extracellulaire pour les HSP90 cytosoliques ont également été trouvées dans le phénomène de métastases cancéreuses (Tsutsumi and Neckers, 2007). Dans ces secteurs, HSP90 interagit avec des protéines clientes avec lesquelles elle n'interagit pas dans le milieu intracellulaire. HSP90 participe au phénomène de métastase (Eustace et al., 2004) et son inhibition dans cette situation est prometteuse (Seo, 2015). Il a même été avancé que le pouvoir anticancéreux des inhibiteurs de HSP90 ne serait dû qu'à l'inhibition des formes extracellulaires (Li et al., 2013a).

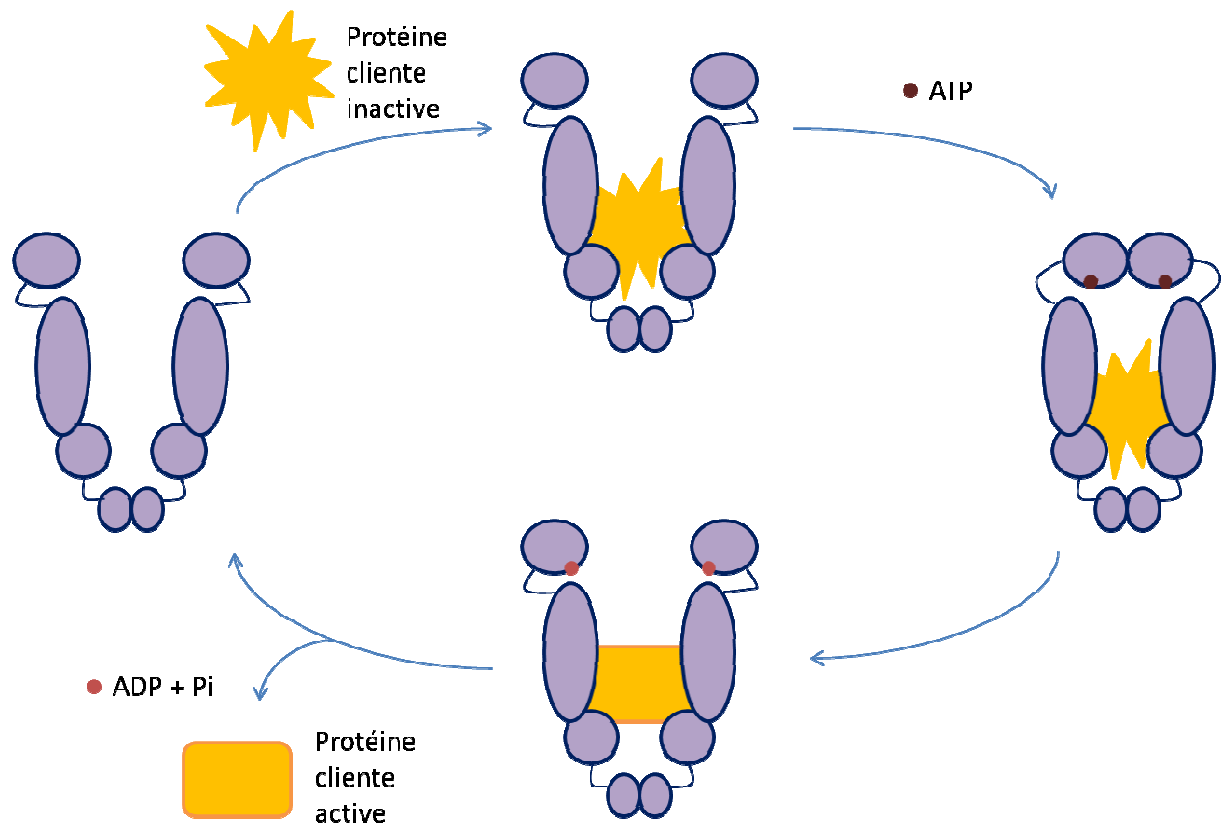


Figure 5 : Fonctionnement d'une HSP90 cytosolique.

D'après (Pearl and Prodromou, 2006). Il peut s'agir d'HSP90 α 1, HSP90 α 2 ou HSP90 β . L'HSP90 lie une protéine cliente à l'état inactif. La liaison et l'hydrolyse de l'ATP par le chaperon induisent un changement de conformation, au cours duquel la protéine cliente devient active et est libérée.

Préambule sur la glycoprotéine 96

Gp96, membre des HSP90 situé dans le RE, n'a été trouvé que dans les organismes multicellulaires et *Leishmania infantum* (Larreta et al., 2000), contrairement aux HSP90 cytosoliques ou encore à BiP, présentes aussi dans des organismes unicellulaires comme les levures (Marzec et al., 2012). Cette particularité suggère peut-être ses fonctions plus importantes dans l'immunité.

3) La glycoprotéine 96 en particulier

Alias

Gp96 est, avec Grp94, le nom le plus couramment usité pour cette protéine. D'autres termes, justifiés par sa localisation, une de ses fonctions ou sa classification selon telle ou telle nomenclature, sont : endoplasmine, *tumor-rejection antigen 1* (Tra-1), Hsp90b1 ou encore HSPC4 (Kampinga et al., 2009).

Sa structure

Le précurseur de Gp96 est composé de 803 acides aminés chez l'homme (802 chez la souris) et, après clivage post-traductionnel du peptide N-terminal, Gp96 compte 782 acides aminés (781 chez la souris) (Mazzarella and Green, 1987). Son extrémité C-terminale s'achève par le signal KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique (RE) (Munro and Pelham, 1987), d'où sa localisation dans cet organite (c'en est une des protéines les plus abondantes) ; pourtant, dans certaines conditions décrites ci-dessous, Gp96 peut migrer dans le secteur transmembranaire et le secteur extracellulaire. Six sites de Gp96 peuvent être N-glycosylés ; ils le sont diversement d'une protéine à l'autre (Wearsch and Nicchitta, 1996), d'où une masse moléculaire légèrement inégale. Les glycanes peuvent se voir greffer des acides sialiques (Suriano et al., 2009). Gp96 peut aussi être phosphorylée *in vivo* (Miyata et al., 2011) sans qu'on en connaisse l'influence.

Gp96 peut oligomériser (Linderöth et al., 2000). En réalité, comme d'autres membres des HSP90, elle semble n'exister qu'à l'état d'homodimère, qui stabilise ses sites actifs (Nemoto et al., 1995), ou d'hétérodimère dans certaines situations (Pagetta et al., 2003). La Figure 6A mentionne les principaux sites particuliers identifiés de Gp96, et qui sont parfois partagés avec les autres HSP90. L'homodimérisation implique la partie C-terminale. L'activité ATPasique de Gp96 serait utile à son activité de chaperon moléculaire (Ostrovsky et al., 2009). L'emplacement des sites de liaison de Gp96 à des protéines clientes n'est pas totalement élucidé. Quant au site de liaison peptidique, il s'agit d'une poche hydrophobe (Sastry and Linderöth, 1999) particulièrement stable, proche de l'interface d'homodimérisation (Linderöth et al., 2000). Un site de liaison peptidique N-terminal a aussi été

suggéré (Vogen et al., 2002). La Figure 6B montre une vue linéaire de Gp96 avec trois de ses principaux sites actifs.

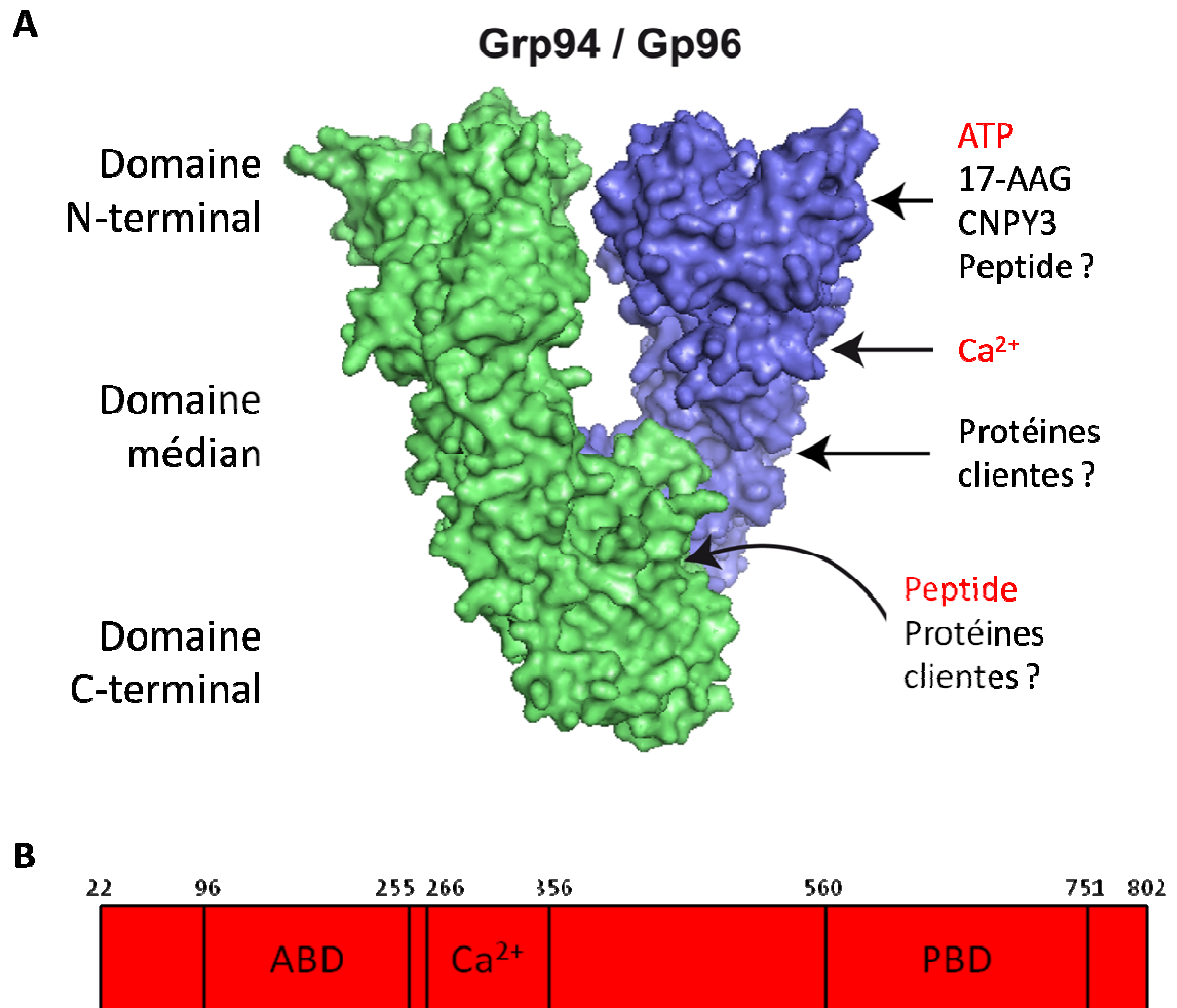


Figure 6 : Structure de Gp96.

D'après (Dollins et al., 2007; Seigniez et al., 2014). Structure **A** tridimensionnelle en homodimère (entrée PDB : 2O1V) et **B** linéaire de Gp96 et mention de ses principaux sites actifs.

17AAG : 17-allylamino-17-déméthoxygeldanamycine ; ABD : domaine de liaison à l'ATP ; ATP : adénosine triphosphate ; CNPY3 : *canopy* 3 ; PBD : domaine de liaison peptidique.

Ses fonctions de chaperon endoplasmique

Les fonctions de Gp96 sont multiples, variées, et loin d'être entièrement élucidées.

Forte de ses sites de liaison à des protéines variées, Gp96 a la fonction de chaperon (Marzec et al., 2012). Protéine ubiquitaire localisée dans le RE, elle participe à la bonne conformation de protéines souvent membranaires et présentant des structures communes (Weekes et al., 2012), dont la liste, de façon intrigante, reste petite, notamment les molécules du CMH de classe II (Schaiff et al., 1992), la protéine membranaire GARP (*glycoprotein A repetition predominant*), contrôlant l'activité des Treg en liant le *transforming growth factor* (TGF) β (Zhang et al., 2015), les TLR et les intégrines (Randow and Seed, 2001), et à l'aiguillage de protéines malformées vers la voie de dégradation associée au RE (Christianson et al., 2008). Gp96 est assistée de *canopy* (CNPY) 3, protéine de la lumière du RE, pour assurer le bon repliement de tous les TLR sauf TLR3 : CNPY3 est un cochaperon de Gp96 (Liu et al., 2010). On ignore si Gp96 interagit avec d'autres cochaperons pour son action sur les autres protéines. L'expression de Gp96 dans le RE est donc cruciale pour de très nombreuses fonctions de la cellule, notamment la fonction immunitaire par sa maturation des TLR et des molécules du CMH de classe II (Liu and Li, 2008). Elle est augmentée par certains stress comme la privation de glucose, la déplétion calcique du RE, un environnement réducteur, l'inhibition du protéasome, la surexpression de protéines malformées... (Yang and Li, 2005). Sa transcription est régulée avec celle de BiP (Liu and Lee, 1991), autre HSP du RE, dont l'action et celle de Gp96 sont complémentaires.

Gp96 est capable de fixer des peptides issus de la dégradation de protéines « en fin de vie » ou malformées de la cellule. En corrélation avec cette faculté, Gp96 contribue à charger les peptides antigéniques sur les molécules du CMH de classe I (Srivastava, 2002a). Il a aussi été montré que Gp96 peut lier des antigènes cancéreux, viraux et bactériens (Srivastava, 2002a).

La glycoprotéine 96 membranaire et extracellulaire

Les divers stress déjà énoncés peuvent induire la translocation de Gp96 dans le secteur transmembranaire et sa sécrétion dans le secteur extracellulaire (Altmeyer et al., 1996). Gp96 peut alors entrer par endocytose dans les CPA (Singh-Jasuja et al., 2000b) ; plusieurs récepteurs membranaires ont été avancés ; CD91 a été proposé comme récepteur majeur (Binder et al., 2000), mais il pourrait s'agir plutôt d'une pinocytose après liaison à des protéoglycanes à sulfate d'héparane

(HSPG) (Jockheck-Clark et al., 2010). Après prise en charge par la machinerie cellulaire de la CPA, peut se produire l'expression dans le contexte du CMH de classe II du peptide antigénique que chaperonnait Gp96 (Doody et al., 2004), ou, par présentation croisée, son expression dans le contexte du CMH de classe I (Suto and Srivastava, 1995). Indépendamment du peptide, il a été montré que Gp96 induisait la maturation des cellules dendritiques (Basu et al., 2000; Singh-Jasuja et al., 2000a), exerçant ainsi le rôle de signal de danger. La glycosylation et la sialylation de Gp96 pourraient influencer dans l'aptitude de Gp96 à exercer ses fonctions immunitaires (Suriano et al., 2005).

Dans le diabète insulino-dépendant, Gp96 plasmatique semble, d'une part, exercer un effet protéolytique, et d'autre part, lier diverses protéines : la chaîne lourde des immunoglobulines G, l'albumine et l' α 1-antitrypsine (Pagetta et al., 2003). L'influence de ces fonctions reste difficile à cerner.

De plus, Gp96 lie le LPS (Reed et al., 2003). Cette faculté est à l'origine de méprises sur les fonctions immunitaires innées de Gp96 : on soupçonne que des expériences ayant montré une activation forte de l'immunité innée aient été réalisées avec des préparations de Gp96 contaminées par le LPS. Si le rôle de Gp96 extracellulaire dans l'immunité adaptative, par induction de la présentation du peptide antigénique chaperonné, n'est pas remis en cause, son activité sur l'immunité innée est controversée (Broere et al., 2011; Tsan and Gao, 2009), bien qu'elle soit encore en partie constatée, par le biais du récepteur CD91 des CPA, avec des préparations de Gp96 ayant subi une décontamination (Pawaria and Binder, 2011). D'autre part, la liaison du LPS à Gp96 peut avoir une signification physiopathologique.

Enfin, l'expression de Gp96 à la membrane apicale de l'épithélial intestinal est augmentée dans la maladie de Crohn (Rolhion et al., 2010), une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) caractérisée par une hyperréactivité de l'organisme contre le microbiote intestinal. Ainsi localisée, elle sert de récepteur à *Escherichia coli* adhérent et invasif pour envahir la circulation générale (Rolhion et al., 2010). De plus, Gp96 permet l'invasion de *Listeria monocytogenes* à travers l'intestin et son pouvoir pathogène subséquent (Cabanès et al., 2005). Dans le côlon, elle lie la toxine A de *Clostridium difficile*, contribuant à la sévérité de l'infection (Na et al., 2008).

Intérêt diagnostique de la glycoprotéine 96

La surexpression de Gp96 en cas de stress a conduit des équipes à essayer de la détecter dans certaines pathologies, des cancers notamment (dont la progression clinique était évaluée sur la base du système *tumor, nodes, metastasis*). Une surexpression de Gp96 a été mise en lumière par immunohistochimie dans les cellules de cancer du sein (Hodorova et al., 2008), de cancer œsophagien, où elle corrèle avec la clinique (Wang et al., 2010), de carcinome hépatocellulaire, où elle corrèle aussi avec la clinique (Zhu et al., 2004), et dans les cellules de cancer de la vésicule biliaire, où elle corrèle avec la clinique et avec un mauvais pronostic (Chen et al., 2015). La protéine Gp96 est détectée par immunohistochimie à la face apicale des cellules épithéliales de l'iléon de patients développant la maladie de Crohn (Rolhion et al., 2010) ; son ARN messenger est retrouvé en abondance dans les cellules épithéliales de l'iléon de patients souffrant de MICI (Wolfram et al., 2013). En outre, la propension de Gp96 à être sécrétée pourrait en faire un biomarqueur plasmatique ou urinaire. Gp96 est augmentée dans le sérum de patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire, même précoce (Block et al., 2015). Elle est aussi augmentée précocement dans l'urine de patients développant un rejet aigu de transplantation rénale (Jia et al., 2009). Dans une étude à visée physiopathologique, Gp96, absente chez les patients sains, a été détectée par immunoempreinte dans le plasma de diabétiques insulino-dépendants (Pagetta et al., 2003).

Enfin, le sérum de patientes ayant développé un carcinome cellulaire squameux lié à une infection à papillomavirus, et non un adénocarcinome, contient des anticorps dirigés contre Gp96 (Bolhassani et al., 2009), suggérant une intervention de la protéine chaperon dans la physiopathologie de la première maladie. Le sérum de patients développant une polyarthrite rhumatoïde et un lupus érythémateux disséminé contient aussi des anticorps anti-Gp96 (Weber et al., 2010).

À ce jour, à notre connaissance, l'utilisation diagnostique de Gp96 n'est standardisée dans aucune pathologie.

Intérêt thérapeutique de la glycoprotéine 96

Gp96 a été envisagée en thérapeutique comme molécule adjuvante d'une part, et comme cible thérapeutique d'autre part.

La recherche médicale s'est beaucoup intéressée à Gp96 depuis que ses propriétés immunitaires originales ont été entrevues. De la Gp96 purifiée à partir de tumeurs d'un modèle murin administrée à des souris de même haplotype les immunisent contre le développement de la même tumeur (Srivastava et al., 1986). Cette fonction adjuvante a été étudiée dans le cadre d'une immunothérapie anticancéreuse, avec des résultats encourageants (Randazzo et al., 2012). Vitespen (ONCOPHAGE[®], développé par Agenus Inc, anciennement Antigenics), médicament qui consiste en de la Gp96 purifiée d'une tumeur autologue et ajustée à une dose précise, a été testé dans de nombreux types de cancer (Testori et al., 2008; Wood et al., 2008) et continue d'être étudié (Crane et al., 2013).

De façon inattendue, l'équipe de Srivastava a découvert que les propriétés immunitaires de Gp96 dans le secteur extracellulaire changent selon sa concentration. L'administration sous-cutanée de 10 µg de Gp96 issue d'un sarcome protège contre ce sarcome quand 100 µg induisent une tolérance spécifique en faveur de ce sarcome (Chandawarkar et al., 1999); de plus, l'administration sous-cutanée de 100 µg, mais pas de 10 µg, de Gp96 issue de foies de souris protège contre le diabète auto-immun et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Chandawarkar et al., 2004). D'autres voies, intrapéritonéale, intradermique, ont été testées, montrant aussi un effet-dose, à d'autres échelles (Chandawarkar et al., 1999). Pour exploiter ce potentiel immunomodulateur à forte dose, l'administration de fortes doses de Gp96 issue du donneur a été essayée pour améliorer la tolérance à la transplantation cardiaque (Slack et al., 2007) et la greffe de peau (Kovalchin et al., 2006): elle a montré un retard du rejet. Plus récemment, il a été montré que l'administration de fortes doses de Gp96 issue de foies de souris favorise le développement de Treg contre les dégâts auto-immuns du modèle murin d'hépatite induite par la concanavaline A (Li et al., 2013b).

Il a été découvert récemment que Gp96 peut aussi jouer un rôle néfaste dans le cancer. Située à la surface cellulaire, elle promeut le cancer du sein en favorisant la dimérisation de HER2 (Li et al., 2015). Son inhibition par un anticorps monoclonal induit l'apoptose (Li et al., 2015; Patel et al., 2013). Gp96 a donc été proposée comme cible dans le traitement du cancer du sein. Enfin, vu son rôle dans sa physiopathologie (voir ci-dessus), Gp96 pourrait aussi être ciblée dans la maladie de Crohn (Rolhion et al., 2010).

B) Le composant C3 du complément

Complément de quoi ?

Voilà plus d'un siècle, il a été montré que le sérum complétait l'action des anticorps en conduisant à la lyse de la cellule spécifiquement reconnue (Ehrlich, 1899 ; Bordet and Gengou, 1901). Ce pouvoir disparaissait après chauffage du sérum à 56 °C pendant 30 min. Le composé sérique thermolabile à l'origine de ce pouvoir a donc été appelé « complément ». Plus tard, cette voie d'activation du complément (après fixation d'un anticorps sur une surface) a été appelée « voie classique » puisque c'était celle qui avait été étudiée d'abord.

Le complément a connu un léger désintérêt scientifique dans les années 1990 mais ses rôles multiples et incontournables dans l'immunité l'ont replacé au premier plan de la recherche ces dernières années (Figure 7).

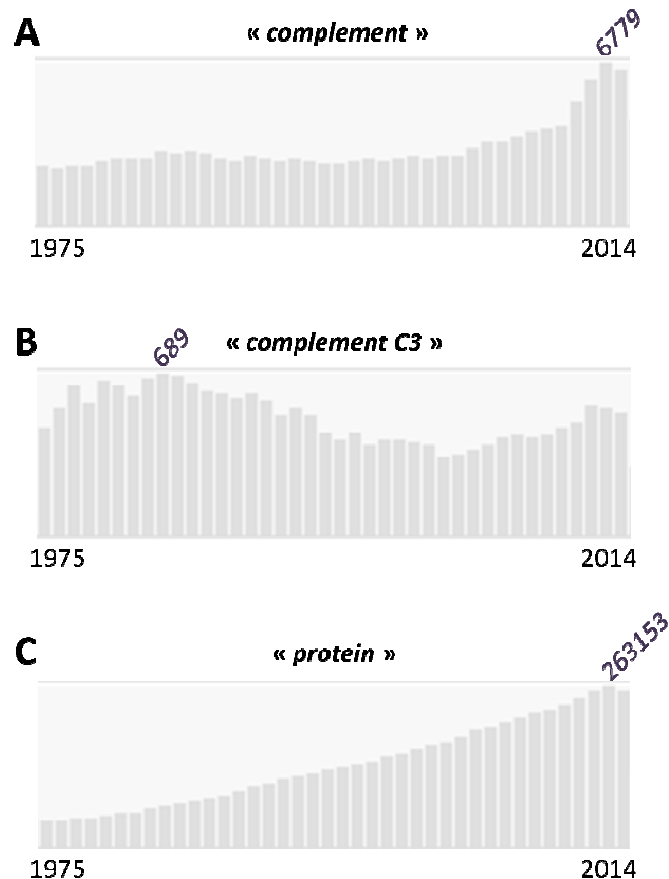


Figure 7 : Évolution du nombre de publications annuelles sur le complément.

Évolution du nombre de publications annuelles sur **A** le complément et **B** le complément C3 par rapport à un thème neutre, **C** la protéine, depuis 1975. Ces histogrammes sont issus de recherches sur PubMed où ces termes en anglais ont été entrés en mots-clés (ncbi.nlm.nih.gov).

Nomenclature

Comme Walport en témoigne (Walport, 2001), la nomenclature du complément est un de ses aspects les moins « *friendly* ». Le complément est un système d'environ trente-cinq protéines, facteurs et régulateurs. Leur nomenclature suit l'ordre de découverte des protéines. La cascade du complément (voir ci-dessous) fait intervenir neuf composants (C) : de C1 à C9. Certains composants peuvent être clivés par des protéases, donnant, pour C3 par exemple, C3a et C3b. En l'occurrence, C3b peut aussi à son tour être clivé. L'appellation « C3 » désigne tantôt la molécule initiale, tantôt elle et l'ensemble des fragments qui en sont issus. Bien qu'impliqués dans la cascade, ces composants peuvent aussi assurer de nombreuses autres fonctions. Des facteurs entrent en jeu dans le fonctionnement et/ou la

régulation de la cascade du complément : ils sont appelés « facteur suivi d'une lettre en capitale d'imprimerie ». Certains d'eux peuvent aussi être clivés, comme le facteur B, qui donne Ba et Bb. Enfin, le système du complément comprend des récepteurs cellulaires spécifiques, aux noms et fonctions variés.

La fixation aux surfaces

Les fragments de C3 suivants : C3b, composant C3 inactivé (iC3b) et C3d sont capables de se fixer à la surface des cellules. Le fragment C4b possède aussi cette fonction. Il s'agit d'une réaction chimique donnant lieu à une des rares liaisons covalentes retrouvées dans le monde biologique. Elle met en jeu le groupement thioester de C3 et un groupement hydroxyle ou amine, produisant une liaison ester ou amide. Ces groupements sont extrêmement abondants en milieu biologique, que ce soit à la surface des cellules ou bien dans les protéines. Lors d'une forte activation de C3 en C3b (voir ci-dessous), C3b, qui cible normalement les surfaces cellulaires, peut en venir à fixer des antigènes présents sur le lieu de l'activation (Anh-Tuan et al., 1984), voire des protéines circulantes (Ramadass et al., 2014), ce qui pourrait, dans ce dernier cas, à la fois limiter le dépôt de C3 et favoriser l'élimination de protéines altérées (Ramadass et al., 2015).

La fixation de fragments de C3 à des surfaces cellulaires est une étape nécessaire à plusieurs fonctions importantes du complément.

Voies d'activation

Le complément est un système de trente-cinq protéines, facteurs et régulateurs. Les facteurs sont solubles et majoritairement produits par le foie, mais certains comme C3 peuvent aussi être produits localement par les cellules endothéliales (Warren et al., 1987), les cellules épithéliales intestinales (Andoh et al., 1993) et certaines cellules immunitaires comme les CPA (Colten and Dowton, 1986) et les lymphocytes T activés (Pantazis et al., 1990). Les lymphocytes T sont d'ailleurs capables d'utiliser le C3 de leur secteur intracellulaire pour produire un signal qui les maintient à l'état actif (Liszewski et al., 2013). Par la multiplicité de ses protéines et des cellules impliquées dans leur production ou leur exposition à la membrane, le complément est un système tentaculaire qui

s'organise en cascade afin de garantir son efficacité, sa globalité, et permettre sa très fine régulation. Quant au fait que certaines protéines du complément peuvent être clivées en fragments aux rôles propres, comme nous allons le voir, cela lui permet d'accompagner de façon adaptée une réponse immunitaire dans la durée (Carroll, 2004; Kemper and Atkinson, 2007).

Bien que son activité ne s'y résume pas, le complément permet la lyse de cellules : pathogènes, cellules infectées et cellules apoptotiques (qui manquent de régulateurs). Trois voies peuvent y mener, qui diffèrent par leur départ, mais convergent toutes vers l'implication de C3b et aboutissent à la perforation de la surface reconnue par le complexe d'attaque membranaire, appelé C5b-9, formé des composants C5b, C6, C7, C8 et C9 du complément (Figure 8). L'initiation des cascades conduit d'abord à la formation d'une convertase de C3, c'est-à-dire une enzyme qui clive C3 en C3a et C3b ; C3b s'assemble ensuite à la convertase de C3, ainsi transformée en convertase de C5, qui permet enfin l'assemblage du complexe d'attaque membranaire. Les convertases diffèrent selon la voie : la convertase de C3 de la voie classique et de la voie des lectines est un complexe C4b2a ; leur convertase de C5 est donc un complexe C4b2a3b. La convertase de C3 de la voie alterne est d'abord C3(H₂O)Bb (c'est-à-dire C3 spontanément hydrolysé, avec le fragment b du facteur B) puis, mettant en place une boucle d'amplification, C3bBb ; sa convertase de C5 est donc un complexe C3bBb3b. Le C3b produit par les voies classique et des lectines peut aussi s'engager dans la voie alterne. Comme il en ressort, C3 occupe une place centrale dans les cascades du complément.

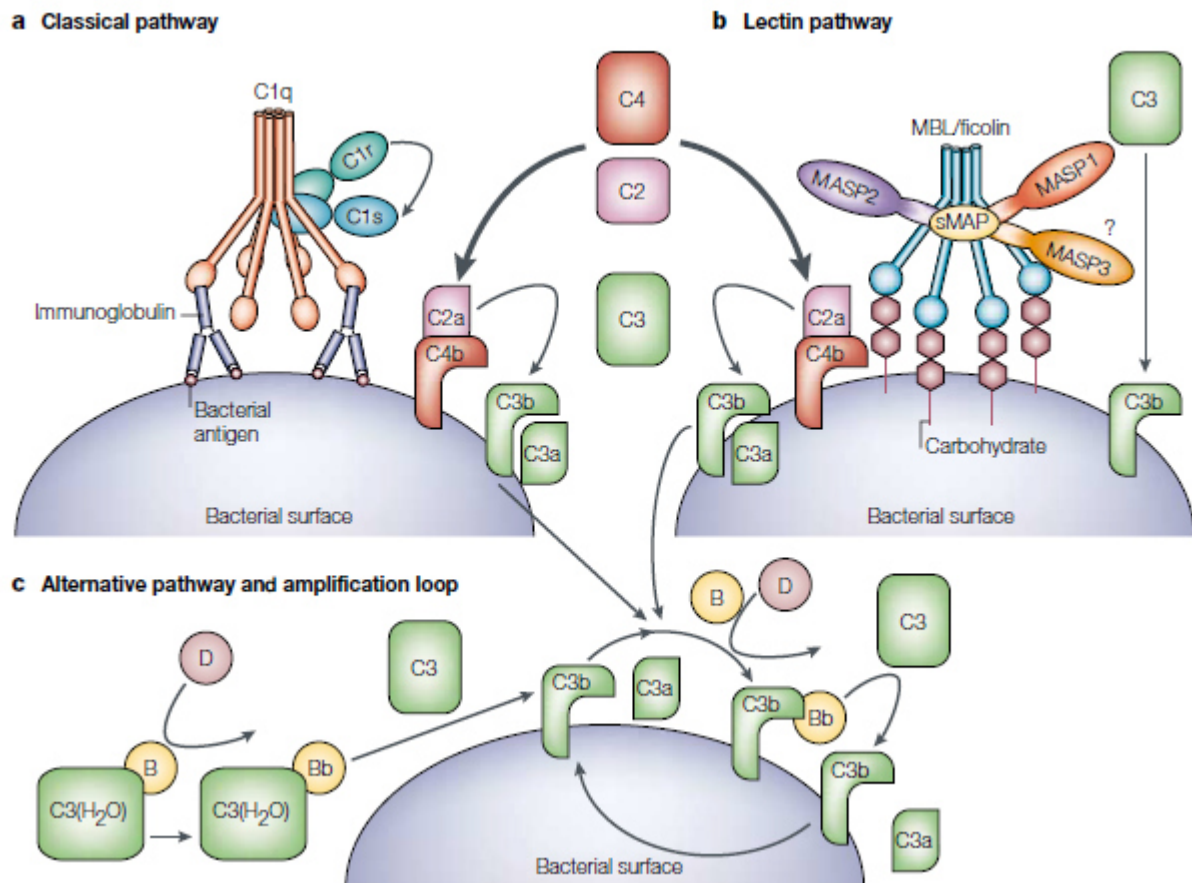


Figure 8 : Voies d'activation de la cascade du complément.

D'après (Fujita, 2002). Ce schéma prend l'exemple d'une activation de la cascade du complément à la surface d'une bactérie, mais pour la voie classique il peut aussi s'agir d'une surface marquée par un anticorps, et pour la voie alterne d'une surface de cellules exposant peu de régulateurs de C3. Au cours de la cascade, C4b et C3b se lient à la surface cellulaire. **A** La voie classique démarre par liaison de C1q à la fraction constante de deux immunoglobulines G ou M engagées dans un complexe immunitaire, causant une réorganisation de C1. C4 et C2 sont ensuite clivés par C1s pour former une convertase de C3. **B** La voie des lectines démarre par la liaison, à un motif carbohydrate (sur une surface bactérienne ou virale le plus souvent), d'une protéine telle une lectine (*mannose-binding lectin*, MBL), associée à plusieurs protéases de la sérine (*MBL-associated serine protease*, MASP). MASP-2 a un pouvoir similaire à C1s et conduit à la formation de la même convertase de C3 que la voie classique. MASP-1 est capable de cliver C3 directement. **C** La voie alterne démarre par l'hydrolyse spontanée et à bas bruit de C3, protéine plasmatique très abondante, sans l'intervention d'aucune surface cellulaire. C3(H₂O) interagit avec le facteur B, que le facteur D clive en Bb, engendrant une convertase de C3

peu active (Bexborn et al., 2008). Le C3b produit se fixe très rapidement à la surface de cellules, où il peut à son tour lier le facteur B, ensuite clivé en Bb par le facteur D, donnant lieu à une convertase de C3 très active : la production de C3b peut alors s'emballer (c'est pourquoi l'on parle de boucle d'amplification). Le C3b engagé avec le facteur B dans la voie alterne peut provenir des autres voies.

Un système toujours au bord de s'activer

Les régulateurs du complément, solubles ou membranaires, créent ensemble une sorte de couvercle dans tout l'organisme afin d'éviter toute activation excessive du complément. La voie alterne est particulièrement surveillée ; elle doit être maintenue à son état d'activation à bas bruit garante de l'homéostasie mais la production de C3b ne pas être exagérée (Ricklin et al., 2010). D'après une étude, 80 % des réponses du complément résulteraient de la boucle d'amplification de la voie alterne (Harboe et al., 2004). Le complexe C3(H₂O)Bb est plasmatique. Le C3b qui en découle n'a donc pas de membrane à proximité préalablement ciblée. Une partie réagit avec des protéines plasmatiques. L'autre se fixe à la surface de cellules. Si ces cellules sont des cellules saines de l'organisme, elles expriment des protéines régulatrices qui empêchent l'implication de C3b dans les convertases de C3 et C5 de la voie alterne (seule la voie alterne est en question en l'occurrence). Le tableau IV décrit nombre de ces régulateurs. Un phénomène majeur régulant le système du complément est le clivage de C3b en iC3b par le facteur I assisté de divers cofacteurs (Tableau IV) : iC3b ne peut en effet pas se substituer à C3b dans les convertases. De nombreux régulateurs entrent en compétition avec le facteur B ; celui-ci lierait les domaines α' NT, CUB et C345C (Janssen et al., 2006) de C3(H₂O) et C3b, en vue de former les convertases de C3 de la voie alterne après son clivage par le facteur D (Forneris et al., 2010). Le domaine α' NT est situé sur la chaîne α 1 de C3 (acides aminés 749 à 954), qui comprend aussi les domaines MG6, MG7 et une partie de CUB (Figure 9). La chaîne α 1, qui, dans la conformation de C3b, est tout exposée, est particulièrement riche en sites d'interactions avec des régulateurs (Tableau IV). Les régulateurs (facteur H, récepteur du complément [CR]1...) entreraient donc en compétition pour la liaison à C3b (Janssen et al., 2006).

Les acides sialiques exposés à la membrane favorisent l'interaction de C3b avec le facteur H, donc l'inhibition de la voie alterne (Fearon, 1978).

Les cellules de l'organisme dont les membranes sont altérées (comme les cellules en apoptose) peuvent en venir à manquer de régulateurs du complément à leur surface, permettant leur élimination par ce système.

À la différence de la voie alterne qui débute spontanément, les voies classique et des lectines démarrent par la reconnaissance d'une cellule qu'il faut éliminer, puisque c'est le ciblage d'un antigène étranger ou d'un carbohydrate (bactérien ou viral le plus souvent) qui déclenche l'initiation de la cascade (Figure 8). Pour autant, elles aussi sont finement régulées par diverses protéines communes avec la voie alterne (facteur I, facteur H...) ou particulières (*C4-binding protein*...).

De nombreux pathogènes ont développé des mécanismes d'échappement à l'action du complément (Merle et al., 2015), par exemple en favorisant l'adhésion de régulateurs du complément (Lewis et al., 2010), en inhibant les voies d'activation du complément (Hallstrom et al., 2011; Kostavasili et al., 1997; Kotwal et al., 1990; Lee et al., 2004) ou en inhibant l'opsonophagocytose (Munoz et al., 1998).

Tableau IV Des régulateurs et des récepteurs du complément, en particulier de C3.

D'après (Zipfel and Skerka, 2009). L'effet de certaines interactions, comme celle du facteur H et de C3d, n'est pas complètement élucidé. Les informations sur les domaines de C3 concernés peuvent être lues grâce aux Figure 9 et 10. Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie.

α' NT : *N-terminus of α' -chain* ; CCP : *complement control protein* (domaine commun aux protéines régulatrices du complément) ; CR : récepteur du complément. ; CUB : *complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1* ; DAF : *decay-accelerating factor* ; MAC-1 : *macrophage 1 antigen* ; MCP : *membrane cofactor protein* ; MG : *macroglobuline* ; TED : *thiolester-bond-containing domain*.

Protéine interagissant	Type cellulaire exprimant la protéine	Fragment(s) de C3 concernés (et autres)	Domaine(s) de C3 directement impliqué(s)	Fonction(s)
Facteur H	Protéine soluble pouvant adhérer aux membranes	C3b C3d (Hellwage et al., 2002)	α' NT, MG7, MG6, CUB et TED (Oran and Isenman, 1999; Wu et al., 2009)	Privation de C3b pour les convertases de la voie alterne. Assistance du facteur I pour les clivages, dans CUB ^f , de

				C3b en iC3b et C3f.
CR1 (CD35)	Nombreuses cellules nucléées Érythrocytes Certains leucocytes	C3b iC3b (et C4b C1q MBL)	α' NT, MG6 et TED (Fremaux-Bacchi et al., 2008; Janssen et al., 2006)	Privation de C3b et C4b pour les convertases. Assistance du facteur I pour les clivages, dans CUB [†] , de C3b en iC3b et C3f, et, dans CUB ^g , d'iC3b en C3dg et C3c. <i>Via</i> les érythrocytes, transport des complexes immuns vers le foie et la rate (Cosio et al., 1990). Phagocytose.
CR2 (CD21)	Lymphocytes B	iC3b C3dg C3d	Parmi le TED, peut-être du côté de MG1 (Clemenza and Isenman, 2000; Janssen et al., 2006)	Abaissement du seuil d'activation et survie (Matsumoto et al., 1991; Weis et al., 1984). Endocytose de complexes immuns (Perrin-Cocon et al., 2004)
CR3 (CD11b/CD18 MAC-1)	Nombreux leucocytes	iC3b (et facteur H)	α' NT (site identique à un site de liaison à CR1) (Janssen et al., 2006) ou CUB (Nishida et al., 2006)	Phagocytose. Chimiotactisme des neutrophiles ? Tolérance <i>via</i> les CPA (Sohn <i>et al.</i> , 2003).
CR4 (CD11c/CD18)	Leucocytes	iC3b	Hors de C3dg	Phagocytose.
MCP (CD46)	Cellules du soi sauf érythrocytes (Wang <i>et al.</i> , 2000)	C3b (et C4b)	Implique MG6 ^a et TED (Fremaux-Bacchi et al., 2008)	Assistance du facteur I pour les clivages, dans CUB [†] , de C3b en iC3b et C3f. En présence d'IL-2, développement par les CD4 d'un phénotype Tr1 (Kemper et al., 2003).
CR1g	Macrophages (notamment cellules de Kupffer)	C3b iC3b C3c	MG3, MG4, MG5, MG6 et LNK (Wiesmann et al., 2006)	Pour C3b, inhibition de la voie alterne du complément. Pour iC3b, phagocytose sans inflammation (Helmy et al., 2006).
DAF (CD55)	Ancré aux cellules du soi	C3b (et C4b)	α' NT et MG7 pour CCP2- CCP3 (Wu et al., 2009)	Privation de C3b et C4b pour les convertases.

Les autres fonctions du complément : une fusée à plusieurs étages

Outre la lyse de cellules reconnues selon les divers modes de ciblage du complément (voies classique, alterne ou des lectines), d'autres fonctions sont assurées par le complément (Tableau IV), qui, souvent, découlent de l'activation de la cascade ou résultent du clivage de C3b.

Les petits fragments C3a et C5a, appelés anaphylaxotines, libérés par l'action des convertases de C3 et de C5, potentialisent hautement la réponse immunitaire innée et adaptative *via* leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des CPA, lymphocytes T, polynucléaires neutrophiles, basophiles et mastocytes (Kwan et al., 2013; Sacks, 2010; Strainic et al., 2008). Cela permet d'enrichir la réponse immunitaire face au danger qui a déclenché la cascade.

C3 est indispensable à l'activité de l'immunité acquise (Zhou et al., 2006), en particulier le C3 provenant des cellules immunitaires, dont la production s'élève au cours d'une inflammation (Peng et al., 2008; Peng et al., 2006; Sandor et al., 2009; Verschoor et al., 2003). Outre l'action des anaphylatoxines, les mécanismes par lesquels le complément stimule les CPA et les lymphocytes T ne sont pas pleinement élucidés (Ghannam et al., 2008). C3b est capable de se lier de façon covalente à un antigène (Anh-Tuan et al., 1984), ce qui, après reconnaissance par CR1 ou CR2, prise en charge et présentation dans le contexte du CMH de classe II par des CPA, induit une réponse T plus forte et durable (Jacquier-Sarlin et al., 1995). Cette faculté découlerait de l'inhibition par C3c (issu de la protéolyse du C3b précédemment fixé à l'antigène) de la protéolyse de l'antigène, dans les phagolysosomes des CPA (Villiers et al., 2008). D'autre part, la *membrane cofactor protein* (MCP, encore dénommé CD46) jouerait un rôle important (Alford et al., 2008) dans la stimulation des lymphocytes T. En présence croissante d'IL-2, produite par les lymphocytes eux-mêmes, MCP induit un phénotype régulateur (Kemper et al., 2003). Cette distinction permet aux lymphocytes T d'abord de traiter le danger, puis, après un certain temps (quand l'IL-2 s'est accumulée), de « refermer » la réponse immunitaire. Les fragments iC3b et C3d stimulent la génération d'anticorps par les lymphocytes B et l'activation des lymphocytes B mémoire (Dempsey et al., 1996; Fang et al., 1998). Là encore, le fait que ce soit C3d, fragment terminal de C3, qui soit impliqué dans l'induction de lymphocytes B mémoire, démontre que le déroulement des fonctions du complément s'adapte à la réponse immunitaire.

Un autre rôle majeur du complément est de favoriser la phagocytose ; ce phénomène s'appelle l'opsonisation. Il fait aussi suite à la fixation de fragments du complément, notamment de C3, à la surface de cellules ; ces fragments du complément sont alors appelés des opsonines. Des récepteurs cellulaires de phagocytes (Tableau IV) sont en effet capables de reconnaître un fragment du complément fixé à sa surface. Une CPA phagocytant une cellule opsonisée par iC3b développe une réponse de tolérance (Schmidt et al., 2006; Verbovetski et al., 2002), quoique certains travaux montrent un renforcement de la réponse T, évoquant l'existence de différents récepteurs et de différentes voies intracellulaires (Baudino et al., 2014). Encore une fois, le fait que la clairance des cellules mortes ou immobilisées ressorte d'iC3b, fragment de C3b, montre que le complément contribue à mettre fin à une réponse immunitaire après y avoir participé.

Structure et clivage du composant C3

C3, C4 et C5 appartiennent à la même famille et sont de structure voisine.

C3 peut être considéré comme un précurseur des formes actives, qui sont ses fragments (Figure 9). C3 n'a pas d'action biologique connue, si ce n'est celle de former C3(H₂O)Bb, la première convertase de C3 de la voie alterne, après hydrolyse du groupement thioester. L'hydrolyse se déroule constamment, à bas bruit, permettant l'activation de la voie alterne en cas d'un quelconque danger (c'est-à-dire de la proximité d'une cellule sans régulateurs du complément). C3 n'est pas lui-même capable de fixation à la surface d'une cellule : son groupement thioester est « enveloppé » dans la protéine (Janssen et al., 2005). L'hydrolyse du groupement thioester induit un changement de conformation qui permet la fixation du facteur B.

Le clivage de C3 en C3a (qui se résume au domaine ANA de C3) et C3b, ainsi que les clivages suivants, changent aussi la conformation de la protéine. La Figure 10 se propose de donner une vue simple de la conformation tridimensionnelle de C3 au cours de ses clivages. Ces changements de conformation, avec les modifications stériques et physicochimiques qui les suivent, sous-tendent les propriétés de chaque fragment en termes de réactivité avec tel récepteur, tel régulateur, tel facteur... (Gros et al., 2008; Janssen et al., 2006; Nishida et al., 2006) (Tableau IV).

Comme nous l'avons vu, C3 est clivé en C3a et C3b par les convertases de C3. C3b est clivé en C3f (un tout petit fragment très peu étudié) et iC3b par le facteur I assisté du facteur H ou de certains récepteurs cellulaires comme CR1 ou MCP. À son tour, iC3b est clivé en C3c et C3dg par le facteur I, mais le facteur H n'intervient pas (Wu et al., 2009) ; c'est CR1 qui assiste le facteur I. Mais ces fragments peuvent aussi être clivés par des protéases circulantes, à des rendements différents (Oikonomopoulou et al., 2013). Le clivage de C3 est une des clés pour comprendre comment le complément accompagne de façon adaptée la réponse immunitaire, chaque fragment exerçant des fonctions utiles à tel moment de la réponse.

Le clivage du complément peut aussi être pathologique : l'antigène spécifique de la prostate, une protéase de la sérine élevée dans le cancer de la prostate, clive C5 et iC3b, réduisant la lyse et la clairance d'éventuels envahisseurs, donc créant un terrain inflammatoire prolongé propice à la cancérogenèse (Manning et al., 2013). Par ailleurs, certaines maladies auto-immunes présentent des auto-anticorps anti-facteur H : ils pourraient empêcher le clivage donc la régulation de C3b (Blanc et al., 2015).

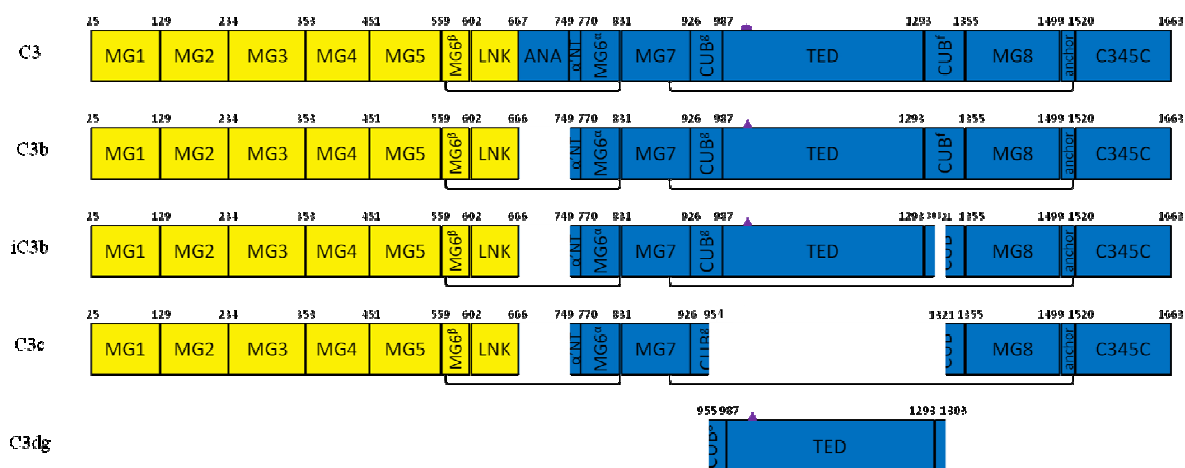


Figure 9 Structure linéaire de C3 et ses principaux fragments de clivage.

Un propeptide de vingt-quatre acides aminés est clivé avant sécrétion. La chaîne β (en jaune) n'est pas sujette aux clivages. Pour la suite il est important de noter que, la dénaturation rompant les ponts disulfure, chaque fragment présente au moins une bande spécifique grâce à la chaîne α (en bleu), sur

immunoempreinte. Le groupement thioester est représenté en violet, inactif (contondant) ou actif (saillant).

α' NT : *N-terminus of α' -chain* ; ANA : anaphylatoxine ; CUB : *complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1* ; LNK : *linker region* ; MG : macroglobuline ; TED : *thioester-bond-containing domain*.

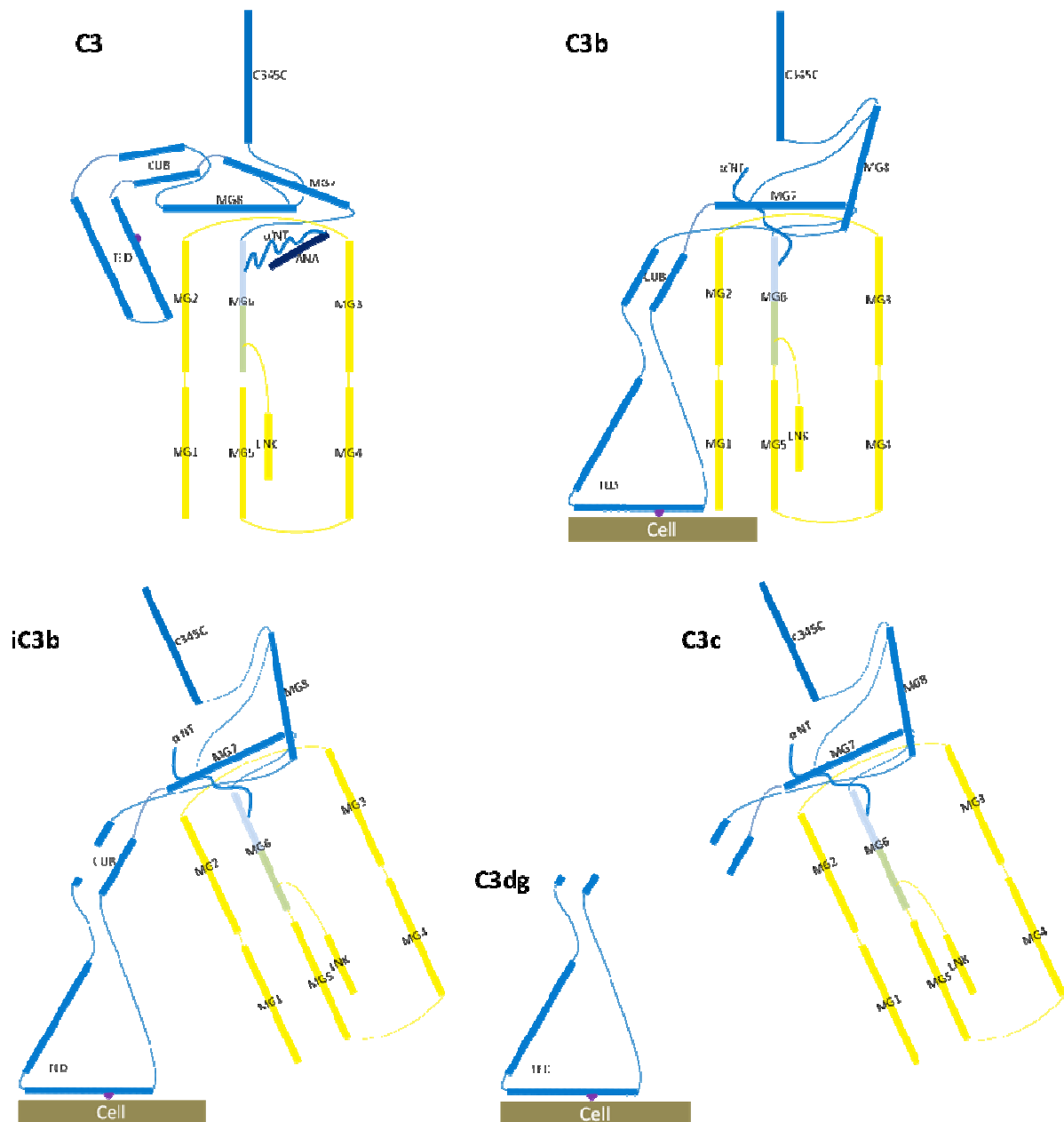


Figure 10 : Structure tridimensionnelle schématique de C3 et ses principaux fragments de clivage.

Le domaine commun aux chaînes β et α est en cyan et vert. La légende de la Figure 9 s'applique ici aussi.

Complément et maladie du greffon contre l'hôte

Le complément est très étudié en physiopathologie, notamment C3. Il est en première ligne de l'immunité innée. Nombre de microorganismes réussissent à échapper à C3 par divers mécanismes, amoindrissant la réponse immunitaire (Merle et al., 2015). Pour leur importance dans l'immunité innée mais aussi acquise, il paraît évident que le complément et C3 en particulier entrent en jeu dans un phénomène physiopathologique comme la GvH. De nombreux composants de la cascade du complément, dont C3, sont consommés après alloCH chez les rats qui développent une GvH (Ballow et al., 1975). De même que C3a et C5a potentialisent fortement la réponse immunitaire « classique », de même cette influence a été documentée dans la réaction allogénique (Cravedi et al., 2013) ; et des antagonistes des récepteurs à C3a et à C5a atténuent la GvH, tandis que des souris receveuses ou donneuses DAF^{-/-}, défaillantes dans la régulation des convertases, donc de l'apparition de C3b, C3a et C5a notamment, l'aggravent (Kwan et al., 2012). Des souris receveuses C3^{-/-} développent une GvH peu sévère (Ma et al., 2012). Quoiqu'une fonction dans la tolérance soit dévolue à C3 dans l'allogreffe de peau (Bartel et al., 2013), ces résultats, sans surprise, prêtent au complément, au moins à C3a, un rôle inflammatoire dans la GvH.

Chez l'homme, C3 est augmenté dans le sérum de patients développant une GvH chronique (Martires et al., 2011) et le dépôt de C3 est important dans les biopsies de peau de patients développant une GvH cutanée (Ma et al., 2014).

Une activation excessive de C3, par défaut de régulateurs par exemple, est à même de causer une inflammation non adaptée et prolongée, potentiellement responsable de maladies auto-immunes. Par exemple, le défaut congénital de DAF est propice aux MICI (Daniels, 1989; Lin et al., 2004). Dans la muqueuse intestinale de patients atteints de MICI, les ARN messagers de C3 et d'IL-17 (cytokine pro-inflammatoire) sont surexprimés et corrèlent fortement (Sugihara et al., 2010), et des dépôts de C3c sont retrouvés à la membrane apicale de l'intestin (Halstensen et al., 1992). Cependant, une déficience en C3 altère la tolérance du système immunitaire au niveau de l'intestin, sans qu'on en connaisse le mécanisme (Pekkarinen et al., 2013).

Au niveau intestinal, le système immunitaire doit assurer la coexistence de l'organisme et du microbiote ; elle doit endiguer le microbiote mais le préserver. Un équilibre similaire existe pour C3,

qui doit être capable de déclencher une réponse immunitaire en cas de danger seulement. Les MICI présentent des aspects communs avec la GvH. Un polymorphisme particulier d'un gène propice au développement de la maladie de Crohn est un facteur de risque pour la GvH, notamment gastro-intestinale, chez les Caucasiens (Holler et al., 2004) mais certes pas chez les Japonais (Tanabe et al., 2011). C3 étant fortement impliqué dans les MICI, son activation au niveau intestinal pourrait être un facteur aggravant dans la physiopathologie de la GvH intestinale.

OBJECTIFS DE LA THESE

Mon travail de thèse s'est déroulé à l'Inserm U866, dans l'équipe du Dr Carmen Garrido. L'équipe travaille depuis de nombreuses années sur le rôle des HSP dans différentes pathologies. Il s'inscrit dans la suite des travaux réalisés par le Dr Anne-Laure Joly.

Les HSP étant des protéines de stress pouvant exercer la fonction de signaux de danger, il avait tout d'abord paru intéressant de chercher si elles pouvaient intervenir dans la physiopathologie de la GvH, une maladie où les signaux de danger jouent un rôle primordial.

D'abord, il a été constaté dans un modèle murin de GvH aiguë que la protéine HSP90 (à proprement parler : les trois membres cytosoliques de la famille des HSP90) était surexprimée dans les tissus intestinaux, cutanés et spléniques de souris développant la GvH. La 17AAG, inhibiteur à l'époque déjà bien connu des HSP90, mais surtout testé dans le cancer (Biamonte et al., 2010), a alors été proposée pour inhiber la GvH. Les résultats ayant montré que la 17AAG augmentait la survie des souris dans le modèle de GvH aiguë développé au laboratoire, nous avons alors cherché à analyser le mécanisme d'action en jeu dans cet effet protecteur. Cette étude a abouti à la publication d'un article dans le journal *Oncogene*.

Lors des investigations préliminaires, il avait aussi été trouvé que Gp96, le membre du RE de la famille des HSP90, était plus abondante dans le sérum de souris développant la GvH, conformément à sa propension à gagner le milieu extracellulaire en cas de stress. Ce résultat nous a amenés à nous poser deux questions : la GvH étant une pathologie manquant de biomarqueurs standardisés (Paczesny, 2013), l'expression sérique de Gp96 peut-elle satisfaire à ce rôle ? Comment Gp96, aux diverses fonctions immunitaires (Srivastava, 2002b), agit-elle dans le milieu extracellulaire au cours de la GvH ? Nos tentatives de réponses composent un article récemment soumis au journal *Blood*.

Enfin, des travaux ayant montré que la vaccination par de fortes doses d'une préparation purifiée de Gp96 pouvait induire la tolérance (Chandawarkar et al., 1999), nous avons envisagé cette stratégie dans notre modèle de GvH aiguë pour susciter la tolérance des lymphocytes T des donneuses

envers les tissus des receveuses. Nos résultats sont inclus dans la discussion après la présentation des deux articles.

RÉSULTATS

Article 1 : **The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft *versus* host disease development**

Article 2 : **Extracellular Gp96 is a chaperone of complement C3 and a serum marker of severity in graft versus host disease**

The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft *versus* host disease development

La GvH, qui consiste en la réponse immunitaire des lymphocytes T du donneur contre les tissus de l'hôte, qu'ils reconnaissent comme étrangers, est une complication potentiellement létale de l'alloCH. La plupart des protéines impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T étant clientes de HSP90 (les trois membres cytosoliques de la famille HSP90), la déplétion de ces cellules par ciblage d'HSP90 a été proposée dans le contrôle de la GvH sur la base d'expériences *in vitro* (Stuehler et al., 2009).

Par ailleurs, il a été montré que la 17AAG, en inhibant HSP90, favorise la réponse au stress du RE, notamment l'activation d'XBP-1 en induisant son épissage dans des lignées cellulaires de myélome (Davenport et al., 2007). Certaines cellules, notamment sécrétoires, sont particulièrement sensibles au stress du RE, telles les cellules de Paneth ; la délétion du gène *Xbp-1* donne lieu à une inflammation intestinale et à la perte de ces cellules (Kaser et al., 2008). Elles jouent un rôle fondamental dans la GvH intestinale. Les dommages intestinaux, induits par le conditionnement à l'allogreffe puis par la GvH elle-même, sont une source colossale de signaux de danger. Les cellules de Paneth sont lésées par la GvH, ce qui résulte en une réduction de la production d' α -défensines, dont le rôle est de maintenir l'écologie du microbiote intestinal (Eriguchi et al., 2012). De plus, les cellules de Paneth servant de niche aux cellules souches intestinales, leur destruction pourrait empêcher la régénération de l'intestin après les dégâts du conditionnement.

Le double pouvoir de la 17AAG à inhiber l'activation des lymphocytes T *in vitro* et à induire la réponse au stress du RE, en particulier l'épissage d'XBP-1, dans des lignées de myélome, nous a conduits à chercher s'il était capable de prévenir la GvH *in vivo* et *ex vivo*, en assurant notamment un effet protecteur au niveau intestinal.

The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft *versus* host disease development

Running title: HSP90 inhibition in graft versus host disease

Abbreviations: 17AAG, 17-allylamino-demethoxygeldanamycin; ER, endoplasmic reticulum; GvHD, graft versus host disease; GvL, graft versus leukemia; HSP, heat shock protein; IBD: inflammatory bowel disease; IEC, intestinal epithelial cell; ISC, intestinal stem cell; UPR, unfolded protein response; XBP1: X-box binding protein 1.

Anne-Laure Joly,^{1,2*} Ayswaria Deepti,^{1,2*} Antoine Seignez,^{1,2,3} Anastasia Demidova,^{1,2} Sophie Hebrard,^{1,2} Elise Schmitt,^{1,2} Sarah Richaud,^{1,2} Eric Fourmaux,^{1,2} Arlette Hammann,^{1,2} Ada Collura,⁴ Magali Svrcek,⁴ Gaetan Jegou,^{1,2} Eric Robinet,^{5,6} Eric Solary,^{7,8} Oleg Demidov,^{1,2} Evelyne Kohli,^{1,2**} and Carmen Garrido^{1,2,9, **£}

¹INSERM UMR 866, « Equipe labellisée » Association pour la Recherche contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, Dijon, France. ²Université de Bourgogne, Dijon, France. ³CHU, Dijon, France. ⁴INSERM, UMR S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France. ⁵INSERM U748, Institut de Virologie, Strasbourg, France. ⁶Institut Hospitalo-Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁷INSERM UMR1009, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁸Université Paris-Sud 11, Villejuif, France. ⁹Anticancer Centre George François Leclerc, Dijon, France.

* Co-first authors

** Co-last authors

£ Corresponding author:

Carmen Garrido

INSERM UMR866

Faculty of Medicine & Pharmacy

7, boulevard Jeanne d'Arc

21079 Dijon, France

Phone: +33 3 80 39 32 56

Abstract

Graft *versus* host disease (GvHD), which is the primary complication of allogeneic bone marrow transplantation, can alter the intestinal barrier targeted by activated donor T cells. Chemical inhibition of the stress protein HSP90 was demonstrated *in vitro* to inhibit T cell activation and to modulate endoplasmic reticulum (ER) stress to which intestinal cells are highly susceptible. Since the HSP90 inhibitor 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17AAG) is developed in clinics, we explored here its ability to control intestinal acute GvHD *in vivo* in two mouse GvHD models (C57BL/6 → BALB/c and FVB/N → Lgr5-eGFP), *ex vivo* in intestine organoids and *in vitro* in intestinal epithelial cultures.

We show that 17AAG decreases GvHD associated mortality without impairing graft *versus* leukemia effect. While 17AAG effect in T cell activation is just moderate at the dose used *in vivo*, we observe a striking intestinal integrity protection. At the intestine level, the drug promotes the splicing of the transcription factor X-box binding protein 1 (XBP1), which is a key component of the ER stress. This effect is associated with a decrease in intestinal damage and an increase in Lgr5⁺ stem cells, Paneth cells and defensins production. The importance of XBP1 splicing control is further confirmed in cultured cells and organoids of primary intestinal epithelium where XBP1 is either shRNA depleted or inhibited with toyocamycin.

In conclusion, 17AAG has a protective effect on the epithelial intestinal barrier in mouse models of acute GvHD. This compound deserves to be tested in the therapeutic control of acute GvHD.

Key words: Graft *versus* host disease, Cancer therapy, HSP90, 17AAG, Intestinal damage.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation remains a major therapeutic approach for hematological malignancies. Its success is limited by acute graft-versus-host disease (GvHD), a life-threatening complication which is a complex process involving donor T cell responses to host antigens.(Ferrara et al., 2009) As most of the signaling proteins involved in T cell activation and proliferation are heat shock protein 90 (HSP90) client proteins, selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of HSP90 has been proposed as a strategy for control of GvHD on the basis of *in vitro* experiments.(Stuehler et al., 2009)

Interestingly, HSP90 has also been reported to have a role in the transcriptional response to endoplasmic reticulum (ER) stress.(Marcu et al., 2002) Moreover, HSP90 chemical inhibitors such as geldanamycin or its less toxic derivative 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17AAG) have been shown to induce the ER stress pathway and particularly the activation of the transcriptional factor X-box binding protein 1 (XBP1) by inducing its splicing in myeloma cancer cell lines.(Davenport et al., 2007; Mimura et al., 2012)

Gut epithelial damage plays a critical role in GvHD as it is the starting point of a vicious circle. Indeed, the early intestinal barrier damage induced by the conditioning regimen (irradiation/chemotherapy) that is needed for eradication of patient's hematopoietic system, causes LPS and bacterial translocation which promotes further inflammation, alloreactive T cell recruitment and, finally, additional gastrointestinal damage thereby increasing the severity of the disease.(Cooke et al., 1998; Hill and Ferrara, 2000; Murphy and Nguyen, 2011; Penack et al., 2010) Paneth cells have been shown recently to play a critical role in this process as they are targeted by GvHD resulting in marked reduction in the expression of α -defensins and disruption of the microbial ecology of the intestine.(Eriguchi et al., 2012) Also, as Paneth cells serve as a niche for intestinal stem cells (ISC) by providing essential signals for stem-cell support,(Sato et al., 2011) their loss could impair epithelium regeneration. The importance of Paneth cells in GvHD was confirmed in a recent clinical study

reporting that low duodenal Paneth cell number in patients at onset of gastrointestinal GvHD may identify patients at high risk for mortality.(Levine et al., 2013) Paneth cells are highly susceptible to ER stress(Kaser et al., 2010) and deletion of the gene *Xbp1* in small and large intestine (*Xbp1*^{*ΔIEC*} mice) promotes the spontaneous development of small intestine inflammation and the loss of Paneth cells.(Kaser et al., 2008) Thus, both in intestinal GvHD and *Xbp1* knockdown animals, a similar induction of immune mediated inflammatory lesions targeting Paneth cells is observed.

The capacity of 17AAG to inhibit T cell activation *in vitro* and to induce the ER pathway and particularly XBP1 splicing in myeloma cancer cells led us to test the hypothesis that it could prevent GvHD *in vivo* and have an effect at the intestinal level. Herein, we show, using two mouse GvHD models (C57BL/6 → BALB/c and FVB/N → Lgr5-eGFP), intestine organoids and primary epithelial cultures, that 17AAG inhibits GvHD development mainly because it preserves intestinal integrity and the antimicrobial barrier. This compound deserves an in-deep preclinical evaluation in GvHD prophylaxis and treatment.

RESULTS

17AAG protects intestinal epithelial cells from ER stress- and T cell- induced death

Intestinal cells have been shown to be highly susceptible to ER stress. 17AAG, a HSP90 inhibitor currently in advanced clinical trials in cancer therapy,(Jego et al., 2013; Neckers and Workman, 2012) used at a concentration of 50 nM that did not induce any significant cell death while still efficiently inducing Hsp72 -a marker of its efficient inhibition of HSP90- (Fig S1A and Fig S1B), delays the death of IEC 4.1 murine intestinal epithelial cells exposed to ER-stress inducers such as thapsigargin (Tg) and tunicamycin (Tm) (Fig 1A). In an epithelial/allogeneic T cells co-culture model that simulates intestinal ER stress in inflammatory conditions, 17AAG also prevented the death of IEC 4.1 cells (Fig 1B). In this model, IEC 4.1 cells were co-cultured with activated allogeneic CD8a⁺ T cells and 17AAG was used at a concentration that does not affect the viability of CD8a⁺ T cells or the expression of the activation marker CD69 at their surface (Fig S1C). In these conditions, 17AAG abrogated T-cell-induced expression of ER-stress actors such as Bip, GP96 and nitric oxide synthase 2 at both protein and mRNA levels in intestinal cells (Fig 1C-D). This protective effect of 17AAG was further tested on organoids (or crypt domains) established from primary intestinal epithelium(Sato and Clevers, 2013) and exposed for 72h to either tunicamycin or activated allogeneic CD8a⁺ T cells. Tunicamycin demonstrated a dramatic effect on organoids by decreasing the number of intact structures, which was prevented by 17AAG (Fig 1E). The drug similarly prevented the dramatic reduction in the number of intact crypt structures induced by exposure to activated allogeneic CD8a⁺ T cells, as the number of intact crypts increased from 38% to 63% in the 17AAG-treated organoids (Fig 1F). These results led us to hypothesize that 17AAG could prevent the death of epithelial cells induced by activated T cells through interaction with the ER stress machinery.

17AAG protective effect *in vivo* during GvHD development

To study 17AAG protective effect *in vivo* we chose a mouse model of GvHD.(Contassot et al., 1998; Couturier et al., 2013) Animals were irradiated before bone marrow (BM) +/- spleen-derived T cells transplantation from allogeneic animals (Allo), transplantation of cells from syngeneic (Syn) animals being used as a control. As expected, BM and Syn animals did not develop a GvHD, while the Allo group developed the disease. More precisely, no mortality was observed in the control groups (Syn and BM), treated (17AAG) or not (vehicle alone), whereas all the mice in the non-treated (vehicle alone) Allo group died from GvHD within 3 weeks. Interestingly, more than 50% of the Allo animals treated with 17AAG (10 mg/kg during 7 days) remained alive (Fig 2A) and 17AAG treatment also reduced weight loss at day 9 post-transplantation (non-treated Allo animals rapidly died at later time points; Fig S2). Of note, the protective effect of 17AAG decreased when a long treatment with the drug was performed (administration of 17AAG every day during 21 days, Fig. 2A), probably because of its toxicity in the prolonged treatment.

17AAG has already been shown to block T-cells activation *in vitro*, we then explored the effect of 17AAG on T cell activation in our GvHD model. 17AAG inhibited primary murine CD3-CD28 T cells activation in a dose-dependent manner, starting at 1 μ M, as showed by the decreased proliferation of CD3⁺ T cells (Fig S3A), the decrease in both the percentage of CD69⁺ in CD3⁺ T cells (Fig S3B) and of IFN γ expressing CD4⁺ T cells (Fig S3C), as well as the decreased activation-induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in T cells (Fig S3D). *In vivo*, in the Allo mice group treated with 17AAG, compared to untreated mice, we also observed a decreased proportion of CD69⁺ in CD3⁺ T cells in the spleen (Fig 2B). However, this decrease was moderate and not significant when MFI values were determined (Fig 2B, right panels).

Since HSPs can play a role during certain hematopoietic differentiation processes,(Didelot et al., 2008; Mjahed et al., 2012) we checked whether HSP90 inhibition impaired hematopoietic reconstitution in our GvHD mice model. This was not the case as comparison of untreated and 17AAG-treated animals failed to demonstrate any difference in the proportion of myeloid progenitors in the bone marrow, and in the number of differentiated cells in the peripheral blood (Fig S4).

We also checked the effect of 17AAG on the beneficial GvL effect of alloreactive T cells in allogeneic transplantation. We first analyzed the anti-leukemia effect of 17AAG in our model using Syn mice injected with A20 leukemic cells (Fig S5). The survival of mice challenged with A20 cells was increased in 17AAG-treated compared to untreated mice. The GvL effect of 17AAG was then analyzed by monitoring tumor growth in allografted mice, treated or not, by *in vivo* bioluminescent imaging. The results clearly showed that 17AAG did not prevent the decrease in the number and size of tumors induced by allogeneic transplantation (Fig 2C).

The modest effect of 17AAG shown in Fig 2B together with the fact that the GvL effect of allogeneic transplantation is preserved by 17AAG treatment suggest that inhibition of T-cell activation may not be the major anti-GvHD effect of this drug *in vivo*.

17AAG increases XBP1 splicing in intestinal cells *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*

To study whether 17AAG protects intestinal cells from ER stress *in vivo* during GvHD development, we explored ER stress markers in the intestine of animals. 17AAG treatment prevented the expression of ER-stress actors such as Bip, GP96 and nitric oxide synthase 2 at both mRNA and protein levels (Fig 3A and 3B). 17AAG treatment also increased the level of the spliced, active form of XBP1, sXBP1, in the mice intestines as determined by qRT-PCR calculating the spliced/unsplliced XBP1 ratio (Fig 3C). 17AAG-treatment increased also the expression of the sXBP1 downstream target gene EDEM1 (Fig 3C). This increase in spliced XBP1 induced by 17AAG was confirmed at the protein level (Fig 3D) and the increase paralleled the expression of HSP72 (Fig 3B, left panel), the well-established clinical and experimental marker of HSP90 inhibition.(Elo et al., 2005) 17AAG-induced increase in XBP1 splicing was also observed in IECs co-cultured with activated allogeneic CD8a⁺ T cells, as determined by the mRNA spliced/unsplliced XBP1 ratio (Fig 4A). Again, this increase in sXBP1 was confirmed at the protein level and the kinetics of sXPB1 increase correlated with that of HSP72 expression (Fig 4B). It is worth noting that, like other authors, we could not detect

in our western blots unspliced XBP1 (a constitutively expressed protein of 34 KDa), reported to be very unstable.(Tirosh et al., 2006)

It was shown previously that the targeted deletion of genes involved in the IRE1/XBP1 branch of the UPR in intestinal epithelial cells (*Irelβ*^{-/-} and *Xbp1*^{ΔIEC} mice) results in a strong inflammatory response.(Bertolotti et al., 2001; Kaser et al., 2008) Moreover, in the absence of XBP1, Paneth cells were unable to manage ER stress and undergo cell death, which compromises the response to pathogenic bacteria.(Kaser et al., 2008) To determine the implication of XBP1 in 17AAG effect protecting intestinal epithelial cells from CD8a⁺ T cell mediated cytotoxicity, we knocked down XBP1 in IEC 4.1 cells by introducing XBP1 targeting shRNA (Fig 4C). As shown in Figure 4D, the protective effect of 17AAG treatment in IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ T cells was abrogated. To further prove the role of XBP1 in 17AAG-induced epithelial cells protection, we used intestinal organoids. As expected, tunicamycin induced a strong cell death in the crypts and 17AAG had a significant protective effect (Fig 4E). When XBP1 splicing was suppressed by adding toyocamycin(Ri et al., 2012) in the organoids cultures, this protective effect was abrogated (Fig 4E). These experiments indicate that XBP1 is implicated in 17AAG protective effect on epithelial intestinal cells.

17AAG protects the intestinal stem cell niche

The protective effect of 17AAG during intestinal GvHD development was further explored by dissecting small intestines from animals in which GvHD was induced. 17AAG treatment significantly reduced the epithelial damage induced by GvHD, 7 days after hematopoietic stem cell transplantation (Fig 5A-B). 17AAG prevented the GvHD-induced decrease in Paneth cells, as quantified by lysozyme staining on histological sections of the small intestine (Fig 5C-D). Quantification of the expression of defensin genes *Defa1*, *Defa4*, *Defa5G*, *DefaRs*, and *Defa21* by qRT-PCR in small intestine sections showed that 17AAG treatment restored, at least partially, their transcription (Fig 5E). Interestingly enough, 17AAG treatment was observed to increase the expression of defensin genes and lysozyme not only in Allo mice but also in BM animals; indeed, BM

mice showed a decrease in the number of Paneth cells compared to control mice (non-grafted, non-irradiated), probably because of the irradiation (Fig 5C-D). As Paneth cells and intestinal stem cells proliferation have been related,(Sato et al., 2011) we examined the ISC markers *Lgr5* and *Olfm4* (olfactomedin-4) in the intestine of GvHD animals. Quantification of *Olfm4* and *Lgr5* gene expression in small intestine sections showed a strong decrease in these two markers in animals developing the GvHD (Allo animals). Interestingly, 17AAG significantly prevented this decrease (Fig 6A). To confirm the beneficial effect of 17AAG on intestinal stem cells, we induced GvHD in mice expressing GFP under control of *Lgr5* promoter in intestinal stem cells. 17AAG was administered to the animals every day (8 mg/kg) during one week, time at which stem cells were counted. As shown in Fig 6B and 6C, the number of GFP (LRG5) positive cells was significantly more important in 17AAG treated animals. Altogether, 17AAG protected intestinal stem cell niche during GvHD development.

DISCUSSION

Since HSP90 plays a central role in multiple pathways and cellular processes such as survival, proliferation, differentiation and apoptosis that are altered in tumour cells,(Moser et al., 2009; Pelicano et al., 2006) HSP90 inhibitors have been developed and are currently tested for cancer therapy.(Biamonte et al., 2010; Neckers and Workman, 2012) Here, we provide experimental data suggesting that 17AAG, the first HSP90 inhibitor to enter advanced clinical trials as an anti-cancer agent, might also be tested to prevent GvHD after allogeneic bone-marrow transplantation. Using mice models of GvHD, we show that 17AAG decreases GvHD-associated mortality without impairing the GvL effect. We confirm an effect of 17AAG on T-cells activation *in vitro* that, however, was hardly significant *in vivo*. Most probably, the drug effect on alloreactive T cells requires drug doses that are not reached *in vivo* and the beneficial effects of the drug are mostly due to the control of ER stress response in intestinal cells.

17AAG effects and toxicity, like that of all active chemical molecules, depends on its concentration. The way inhibitors of HSP90, such as 17AAG, functions in cancer *versus* normal cells

have not yet been elucidated. These molecules are effective at killing cancer cells but they strongly induce HSP72, which has a cytoprotective effect. Concerning normal cells, several groups have reported that 17AAG, when given transiently or at low doses, favors cell survival of neuronal cells.(Bradley et al., 2014; Wang et al., 2011) 17AAG has been reported also to protect neural progenitor cells from ischemia-induced death.(Bradley et al., 2014) Thus, the effects of 17AAG may depend on the dose and cell type. In our *in vitro* experiments, we show that 17AAG, when used at a sublethal dose (nanomolar range), clearly protects intestinal cells as well as crypt organoids from ER stress induced by CD8a T cells or synthetic ER stress inducers. In contrast, 17AAG effect inhibiting T cell activation was observed only at micromolar concentrations ($\geq 1\mu\text{M}$, this paper and ref. 2). *In vivo*, at the dose of 10mg/kg i.p. during 7 days, while no toxicity of 17AAG was apparent, a clear protective effect of 17AAG on the intestinal mucosa was observed (Fig 5-6).

Highly secretory cells such as Paneth cells are vulnerable to ER stress and thus dependent on a proper UPR for their homeostasis. The importance of the IRE1/XBP1 branch of the UPR in the intestine has been demonstrated using *Ire1 β* ^{-/-} and *Xbp1* ^{Δ IEC} mice (IEC-specific gene deletion).(Bertolotti et al., 2001; Kaser et al., 2008) Interestingly, as in the inflammatory bowel diseases (IBDs) that develop the *Ire1 β* ^{-/-} and *Xbp1* ^{Δ IEC} mice,(Kaser et al., 2008) in our GvHD mice model Paneth cell loss could be the consequence of an unresolved ER stress, resulting from both irradiation and allogeneic reaction. Accordingly, their recovery in 17AAG treated mice correlates with activation of XBP1. We have shown that Paneth cell recovery in 17AAG treated mice is associated with an increase in defensins. By increasing α -defensin production, 17AAG may limit intestinal inflammatory response and partially restore homeostasis.(Salzman et al., 2010)

In addition to Paneth cells increase, 17AAG also increases Lgr5⁺ stem cells in mice expressing GFP in Lgr5 positive intestinal stem cells. Wnt/ β -catenin signaling has been shown to support intestinal homeostasis by regulating proliferation in the crypt. The source of Wnt *in vivo* may be epithelial (i.e. Paneth) or stromal cells.(Kabiri et al., 2014) However, as in our work 17AAG protects organoids from tunicamycin and CD8a cell death and organoids lack stroma cells, we can hypothesize that it is Paneth cell restoration induced by 17AAG that may provide signals for

supporting stem cells. Interestingly, a decrease in intestinal stem cells has already been reported during GvHD.(Hanash et al., 2012; Takashima et al., 2011) In accord with these results, we have observed that IL-22 production, which has been shown to be inhibited during GvHD,(Hanash et al., 2012) is partially restored by treating the mice with 17AAG (Fig S6).

Altogether, these results show that unresolved ER stress is involved in GvHD and that 17AAG, by inducing sXBP1, may protect Paneth cells and the intestinal stem cell niche. The major consequences are a reduction of intestinal damage and a restoration of the anti-bacterial and regulatory properties of α -defensins that probably play a critical role in the pathophysiology of GvHD. Of note, Bortezomid, a proteasome inhibitor that like 17AAG induces XBP1 splicing(Mimura et al., 2012) has been shown to protect from GvHD in preclinical and clinical studies.(Choi and Reddy, 2014)

It has been reported that 17AAG attenuates colitis, both acute and chronic, through enhanced secretion of anti-inflammatory IL-10 and both Treg number and efficiency,(Collins et al., 2013) thus providing proof of principle for the application of HSP inhibitors in the treatment of IBD. It remains to be explored if this anti-inflammatory response induced by 17AAG takes place also during GvHD development. Different HSP90 inhibitors already have gone through clinical trials as anticancer agents with encouraging results. Our study highlights the possibility of extending their clinical use for the prevention of GvHD.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals are obtained from Sigma Aldrich unless otherwise stated.

Animal studies

Lethally irradiated (9 Gy total body irradiation) females (7-10 weeks) BALB/c (H-2^d) (Charles River, France) or Lgr5 (Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)-eGFP-Ires-CreERT2 mice kindly provided by Dr Hans Clevers (Utrecht, The Netherlands) were engrafted with 10⁶ bone marrow cells alone (BM) or together with 10⁷ splenic cells from syngeneic animals (Syn), or from allogeneic C57BL/6 (H-2^b) or FVB/N mice (Allo) injected in the retro-orbital sinus. Mice received neomycin *per os* (1,1g/l) to prevent infections to develop. Animals of equivalent weight were blindly assigned to the different groups. 17AAG (Invivogen, France) diluted in PBS/DMSO (v/v) or vehicle alone were i.p. administered. For graft *versus* leukemia (GvL) study, A20 leukemia cells (A20-luc, H-2^d), kindly provided by P.Saas (Besançon, France) were intravenously (tail) injected in recipient BALB/c mice together with 10⁶ bone marrow cells. On the same day or on day 7, 10⁷ or 5x10⁶ splenic cells from C57BL/6 mice were injected and mice were treated or not with 17AAG (10 mg/kg) for 7 days. The survival was followed and/or the tumor growth analyzed by bioluminescence imaging (In Vivo F PRO Carestream Healthcare) after injection of mice with 150 mg/kg of D-luciferin sodium salt (Clinisciences, France). Recipient mice were scored for clinical signs of GvHD as previously described (Cooke et al., 1996) three times a week. Investigator blindly determined for each animal: body weight, posture, activity, fur texture and skin integrity (scored from 0 to 2 for a total possible score of 10). Animal reaching score 6 or above were sacrificed for ethical reasons. The ethic committee of the Burgundy University approved all animal protocols.

Histological study

Mouse intestine were fixed with 4% paraformaldehyde overnight and included in paraffin. For immunohistochemical analysis, sections were deparaffinized, and for analysis of intestinal damage, ileal sections were stained with hematoxylin/eosin. For Paneth cells and Lgr5-eGFP intestinal stem cells analysis, sections were stained with anti-lysozyme antibody (A0099, Dako, USA) and anti-GFP antibody (2555, Cell Signaling, USA). Secondary anti-rabbit-HRP antibody was added, followed

by development with NovaRED Peroxidase Substrate Kit (Vector laboratories, CA). Slides were counterstained with Mayer's hematoxylin dehydrated and mounted with Eukitt.

Intestinal epithelial cell (IEC) culture and co-cultures with CD8a Tcells.

The 4.1 IECs (kindly provided by Dr A. Jevnikar, Ontario, CA) were cultured as described before.(Li et al., 1997) For XBP1 depletion, an shRNA inserted in the lentiviral vector psiHIV-U6 (GeneCopoeia, MD) was used. Activated CD8a⁺ T cells were isolated from spleen of C57BL/6 mice using mouse CD8a⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) and added at a 1:4 T cell:IEC ratio.(Werner et al., 2011) Supernatant was analyzed every 24h for cell death using cellular DNA fragmentation ELISA (Roche, Germany).

Intestinal organoids

Intestinal crypts from Lgr5-eGFP mice were isolated, as described by Sato *et al.*(Sato and Clevers, 2013; Sato et al., 2009) and placed in Matrigel in DMEM/F12 medium with murine recombinant EGF and Noggin (Peprotech) and Human recombinant R-spondin (R&D Systems). Growing crypts were treated with 17AAG, tunicamycin, toyocamycin or T cells and viable structures were counted.

T cell activation

Automacs sorted CD3⁺ or CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) isolated from total splenocytes using nylon wool columns, were activated with CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen, Marly-le-Roi, France) and 100 U/mL mouse recombinant IL-2 (R&D system, Lille, France), and cultured in complete medium supplemented with 10% FBS.

Flow cytometry experiments

T cell proliferation was analyzed using Cell Trace dilution (Life Technologies, France).

Activated T cells in spleens from recipient mice or from control mice after CD3/CD28 activation were quantified using antibodies directed against CD3 (100334, Biolegend, France), CD69 (17-0691-82, eBioscience, France) or IFN γ (11-7311-41, eBioscience, France). When needed, cells were permeabilized using Fixation/Permeabilization kit from eBioscience.

To explore hematopoietic reconstitution, bone marrow cells were stained with a biotinylated antibody cocktail containing CD71-PE (553267), Sca1-PE (553108), c-Kit-APCH7 (560185), CD34-FITC (553079), and CD16/32-PECy7 (560829), Ter119-BV421 (563998), Mac1-Alexa Fluor 647 (557686), and Gr1-FITC (553127, BD Pharmingen, France) as already described.(Aucagne et al., 2011) Revelation was obtained using streptavidin-Alexa Fluor 405 (Invitrogen).

Western blotting

Western blots were performed as already described(Rerole et al., 2011) from cells and tissues lysed in a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.5, 350 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, and 1% NP-40. Primary antibodies: spliced (s)XBP1 (#12782), phosphorylated AKT (#4051) and ERK1/2 (#4695, Cell Signaling Technology, MA), HSP72 (ADI-SPA-812), GP96 (ADI-SPA-851), Bip (ADI-SPA-826, Enzo Life Sciences, NY) or β -actin (ab8229, Abcam, UK). Secondary antibody: horseradish peroxidase-conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. PA).

RNA Extraction and Real Time RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription was carried out with 2 μ g RNA and Random primers using M-MLV RT mix (Promega). Real-time RT-PCR

method using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) to determine the expression of UPR and defensins genes has been described previously.(Cawley et al., 2011; Eriguchi et al., 2012) For IL-22, OLFM4, sXBP1 and Lgr5 RNA quantification, primers and probe were designed using Life Technologies design tool. Relative expression was calculated with $\Delta\Delta C_T$ method. Levels of spliced/unspliced XBP1 were calculated by comparing with the values of total XBP1.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism software. Two-tailed Mann Whitney test was used to analyze two groups. ANOVA test was carried out on data sets with more than two groups. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank J. Haiech (University of Strasbourg), P. Saas and B. Gaugler (INSERM U1098, Besançon, France), for helpful discussions. We thank P. Saas, H. Clevers (Hubrecht Institute, The Netherlands) and A. Jevnikar (Ontario, CA) for providing A20-luc cells, Lgr5-eGFP mice and IEC 4-1, respectively, and A. Bouchot and J.F. Merlin (INSERM U866, Dijon, France) for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the *Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche*, Ligue Nationale Contre le Cancer (“Labeled teams” to CG

and ES), the Association pour la Recherche sur le Cancer (labeled team to CG and OD), and FEDER. CG team belongs to the LabEx LipSTIC and GR-Ex. A.-L.J. has a doctoral fellowship from *La Ligue Nationale Contre le Cancer* and AD by the “Conseil Régional de Bourgogne”.

BIBLIOGRAPHY

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;**373**:1550-1561.
2. Stuehler C, Mielke S, Chatterjee M, Duell J, Lurati S, Rueckert F *et al*. Selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of heat shock protein 90: a novel strategy for control of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;**114**:2829-2836.
3. Marcu MG, Doyle M, Bertolotti A, Ron D, Hendershot L, Neckers L. Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Molecular and cellular biology*. 2002;**22**:8506-8513.
4. Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, Sharp SY, Workman P, Morgan GJ *et al*. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*. 2007;**110**:2641-2649.
5. Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, Tai YT, Cirstea D, Santo L *et al*. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 2012;**119**:5772-5781.
6. Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, Bungard D, Brinson YS, Delmonte J, Jr. *et al*. Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 1998;**102**:1882-1891.
7. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;**95**:2754-2759.
8. Murphy S, Nguyen VH. Role of gut microbiota in graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma*. 2011;**52**:1844-1856.
9. Penack O, Holler E, van den Brink MR. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood*. 2010;**115**:1865-1872.
10. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H *et al*. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood*. 2012;**120**:223-231.
11. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M *et al*. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2011;**469**:415-418.
12. Levine JE, Huber E, Hammer ST, Harris AC, Greenson JK, Braun TM *et al*. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood*. 2013;**122**:1505-1509.
13. Kaser A, Martinez-Naves E, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;**26**:318-326.
14. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H *et al*. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008;**134**:743-756.

15. Jegu G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters*. 2013;**332**:275-285.
16. Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;**18**:64-76.
17. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013;**340**:1190-1194.
18. Contassot E, Murphy W, Angonin R, Pavy JJ, Bittencourt MC, Robinet E *et al*. In vivo alloreactive potential of ex vivo-expanded primary T lymphocytes. *Transplantation*. 1998;**65**:1365-1370.
19. Couturier M, Lamarthee B, Arbez J, Renauld JC, Bossard C, Malard F *et al*. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia*. 2013;**27**:1527-1537.
20. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp Cell Res*. 2012;**318**:1946-1958.
21. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Bouchot A, Cartier J, Jacquel A *et al*. Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ*. 2008;**15**:859-866.
22. Elo MA, Kaarniranta K, Helminen HJ, Lammi MJ. Hsp90 inhibitor geldanamycin increases hsp70 mRNA stabilisation but fails to activate HSF1 in cells exposed to hydrostatic pressure. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;**1743**:115-119.
23. Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, Ploegh HL. Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry*. 2006;**281**:5852-5860.
24. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH *et al*. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest*. 2001;**107**:585-593.
25. Ri M, Tashiro E, Oikawa D, Shinjo S, Tokuda M, Yokouchi Y *et al*. Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood cancer journal*. 2012;**2**:e79.
26. Moser C, Lang SA, Stoeltzing O. Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res*. 2009;**29**:2031-2042.
27. Pelicano H, Carew JS, McQueen TJ, Andreeff M, Plunkett W, Keating MJ *et al*. Targeting Hsp90 by 17-AAG in leukemia cells: mechanisms for synergistic and antagonistic drug combinations with arsenic trioxide and Ara-C. *Leukemia*. 2006;**20**:610-619.
28. Biamonte MA, Van de Water R, Arndt JW, Scannevin RH, Perret D, Lee WC. Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. *J Med Chem*. 2010;**53**:3-17.
29. Bradley E, Zhao X, Wang R, Brann D, Bieberich E, Wang G. Low dose Hsp90 inhibitor 17AAG protects neural progenitor cells from ischemia induced death. *Journal of cell communication and signaling*. 2014;**8**:353-362.
30. Wang G, Krishnamurthy K, Tangpisuthipongsa D. Protection of murine neural progenitor cells by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in the low nanomolar concentration range. *Journal of neurochemistry*. 2011;**117**:703-711.

31. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* 2010;**11**:76-83.
32. Kabiri Z, Greicius G, Madan B, Biechele S, Zhong Z, Zaribafzadeh H *et al.* Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development (Cambridge, England).* 2014.
33. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K *et al.* The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med.* 2011;**208**:285-294.
34. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV *et al.* Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity.* 2012;**37**:339-350.
35. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nature reviews Clinical oncology.* 2014;**11**:536-547.
36. Collins CB, Aherne CM, Yeckes A, Pound K, Eltzschig HK, Jedlicka P *et al.* Inhibition of N-terminal ATPase on HSP90 attenuates colitis through enhanced Treg function. *Mucosal Immunol.* 2013;**6**:960-971.
37. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood.* 1996;**88**:3230-3239.
38. Li XC, Jevnikar AM, Grant DR. Expression of functional ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules by an immortalized epithelial cell clone derived from the small intestine. *Cell Immunol.* 1997;**175**:58-66.
39. Werner T, Wagner SJ, Martinez I, Walter J, Chang JS, Clavel T *et al.* Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn's disease-like ileitis. *Gut.* 2011;**60**:325-333.
40. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;**459**:262-265.
41. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A *et al.* Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2011;**121**:2361-2370.
42. Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, Pais de Barros JP, Hammann A *et al.* Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research.* 2011;**71**:484-495.
43. Cawley K, Deegan S, Samali A, Gupta S. Assays for detecting the unfolded protein response. *Methods Enzymol.* 2011;**490**:31-51.

Figure legends

Fig 1: 17AAG protects intestinal epithelial cells from ER stress- and T cell-induced death.

(A) Cell viability (BrdU-ELISA) of IEC 4.1 cells treated for the indicated days with 17AAG 0.05 μ M or the vehicle alone (Ctl) and/or thapsigargin (Tg, 2.5 nM, left panel) and/or tunicamycin (Tm, 0.1 μ g/ml, right panel). (B) Viability of IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ sorted T cells (4:1 ratio) and treated or not with 0.05 μ M 17AAG for up to 3 days. Reduction of viability was assessed by BrdU-ELISA at indicated time points. Bars: mean \pm SD, n=4. * $p<0.05$. ** $p<0.005$. (C) Western blot analysis for Bip and GP96 in IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ T cells and treated or not with 17AAG during 48 h. One representative experiment is shown (n=3). (D) IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ T cells and treated or not with 17AAG were subjected to RT-PCR and the expression level of indicated genes was quantified after normalization against *GAPDH*. Bars: mean \pm SD from three independent experiments. Anova test * $p<0.05$. ** $p<0.005$. (E) Crypt organoids from adult mice after co-culture with tunicamycin and/or 17AAG. Percentage of intact organoids was calculated after 72h of treatment (5 animals per group). (F) Upper panel: crypt organoids from Lgr5-eGFP mice after co-culture with CD8a⁺ sorted T cells were either left untreated (NT, vehicle alone) or treated with 17AAG (0.05 μ M) during 72h. Ctl: control organoids not co-cultured with CD8a⁺ sorted T cells. Magnification x 40. A representative image is shown. Lower panel: intact organoids were counted at 72h of treatment. Bars: mean \pm SD from three independent experiments. Anova test ** $p<0.005$ (5 animals per group).

Fig 2: 17AAG delays GvHD development while not impairing the GvL effect.

(A) Survival curves of BALB/c recipient mice transplanted with 10^6 BM cells and 10^7 splenic cells from BALB/c mice (Syn, n=12), 10^6 BM cells from C57BL/6 mice (BM, n=12) or 10^6 BM cells and 10^7 splenic cells from C57BL/6 mice (Allo, n=18) and treated (open symbols) or not (vehicle alone,

filled symbols) with 17AAG (10 mg/kg) daily during 7 or 21 days (n=12). 3 distinct experiments were performed. Survival curves were analyzed using Mantel-Cox test; *** $p < 0.001$. * $p < 0.05$. **(B)** Quantification and mean intensity fluorescence (MFI) of activated T cells (CD3⁺ CD69⁺) in spleens from BALB/c mice transplanted with 10⁶ BM and 10⁷ splenic cells from C57BL/6 mice and treated with 17AAG (10 mg/kg during 7 days) or with the vehicle alone (NT). Results are presented as mean \pm SD, n=4 animal/groups. One representative experiment out of 3 is shown. * $p < 0.05$. **(C)** BALB/c recipient mice transplanted with 10⁶ BM cells and 5x10⁶ splenic cells from C57BL/6 mice (Allo), challenged with A20 cells (5x10⁵) and treated or not with 17AAG (10 mg/kg) daily for 7 days (4 animals per group). *In vivo* bioluminescent imaging against luciferase activity on day 10, 15, 21 and 28 post-transplantation monitored tumor growth. Right panel, one representative experiment is shown. * $p < 0.05$, n=3 independent experiments.

Fig 3: Intestinal splicing of XBP1 induced by 17AAG treatment *in vivo*.

(A) Expression levels of indicated genes from small intestinal samples were quantified by qRT-PCR and normalized against *GAPDH* levels (n=3). **(B)** Representative western blot for Bip and GP96 in small intestinal samples of animals sacrificed at day 7 after transplantation with 10⁶ bone marrow cells from C57BL/6 mice (BM) or 10⁶ bone marrow cells and 10⁷ splenic cells from C57BL/6 mice (Allo), and treated or not (vehicle alone) with 17AAG. Lower panel, densitometric analysis of immunoblots (n=3 independent experiments with 3 animals per group). **(C)** qRT-PCR for EDEM1 and XBP1 in small intestinal samples treated or not with 17AAG, during 7 days. The expression level of indicated genes was quantified normalizing against GAPDH. Ratios of spliced versus unspliced XBP1 are shown (n=3). **(D)** Representative western blot analysis of sXBP1 and HSP72 in small intestinal samples of animals sacrificed at day 7 after transplantation with 10⁶ bone marrow cells from C57BL/6 mice (BM) or 10⁶ bone marrow cells and 10⁷ splenic cells from C57BL/6 mice (Allo), and treated or not with 17AAG. Lower panel, quantification by densitometry (3 distinct experiments, 3 animals per group).

Fig 4: 17AAG induces XBP1 splicing in IEC 4.1 cells and crypt organoids

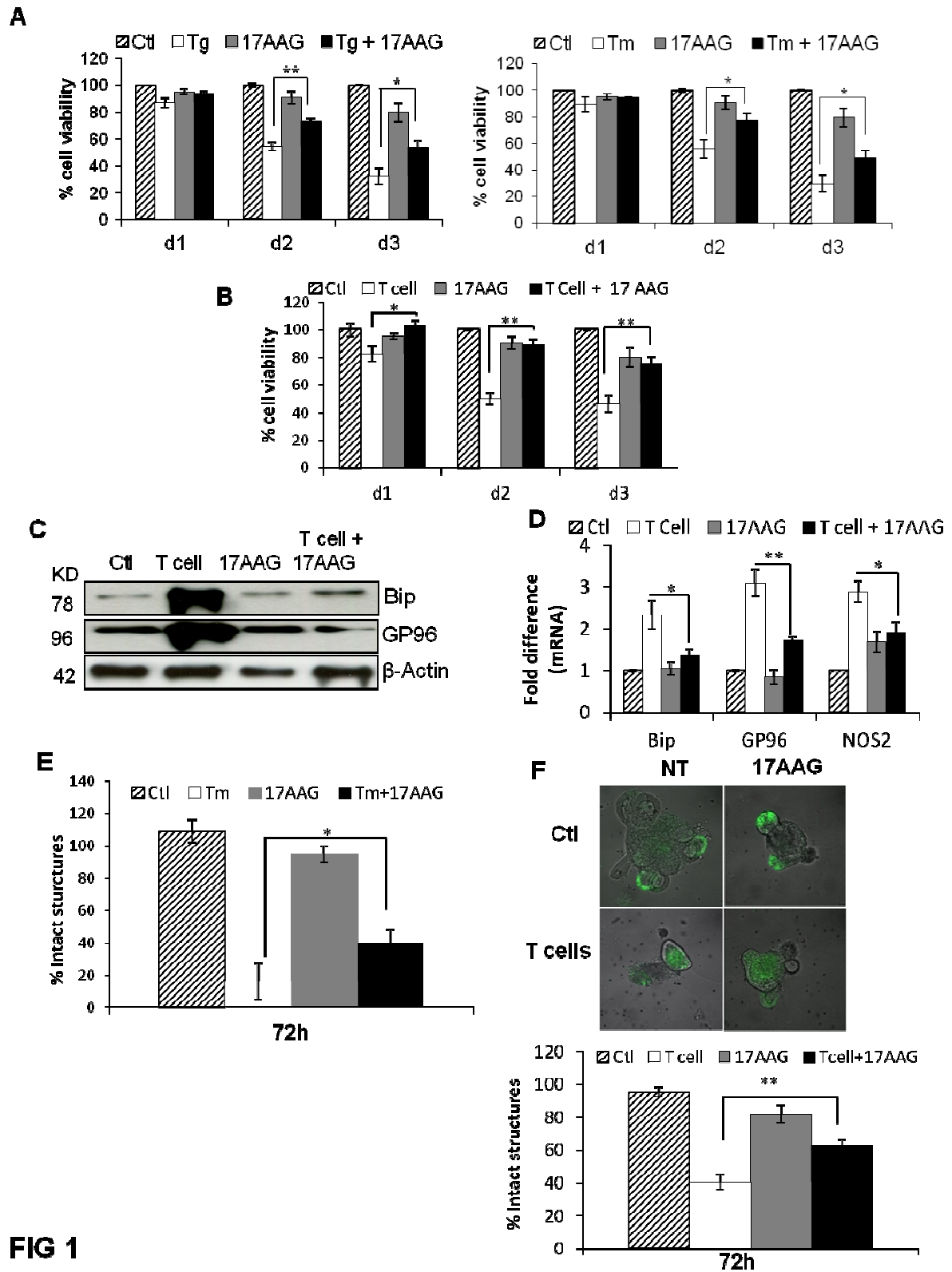
(A) Expression of XBP1 and EDEM1 was determined by qRT-PCR (normalized against GAPDH; n=3) in IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ T cells and either left untreated (vehicle alone) or treated with 17AAG for 24h. For spliced XBP1, ratios of spliced versus unspliced XBP1 mRNA are presented. (B) Western blot analysis of sXBP1 and HSP72 in IEC 4.1 cells co-cultured with CD8a⁺ T cells (4:1 ratio) treated or not with 0.05 μ M 17AAG for the indicated times (n=3). Lower panel, densitometric analysis of immunoblots (n=3 independent experiments). (C) Western blot analysis of sXBP1 in IEC 4.1 cells transduced with a lentivirus expressing XBP1 targeting shRNA and co-cultured with activated CD8⁺ T cells for 8h. Actin is used as a loading control (n=4). (D) IEC 4.1 cells expressing either an shRNA control or against XBP1 were either left untreated or treated with 0.05 μ M 17AAG and co-cultured with CD8a⁺ T cells (4:1 ratio) for 48h. The reduction in cell viability was determined by BrdU-ELISA. Bars: mean \pm SD from three independent experiments performed in triplicate; ** $p < 0.005$. (E) Crypt organoids from adult mice were cultured during 3 days with tunicamycin (Tm) or toyocamycin (Toy) and/or 17AAG (0.05 μ M) or the vehicle alone (Ctl). The percentage of intact organoids was calculated (n=3). Bars: mean \pm SD from three independent experiments. Anova test * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

Fig 5: 17AAG treatment decreases intestinal damage and protects Paneth cells in small intestine sections

(A) Histological aspects of small intestine sections of mice transplanted with 10⁶ BM cells from C57BL/6 mice (BM) or 10⁶ BM cells together with 10⁷ splenic cells from C57BL/6 mice to allow GvHD development (Allo), and treated or not (vehicle alone) with 17AAG (10 mg/kg). Animals were sacrificed at day 7 after hematopoietic stem cell transplantation and small intestine sections were stained with hematoxylin/eosin. A representative image is shown (3 distinct experiments with n=5 animals per group). Upper and lower images, x2.5 and x10 magnification, respectively. (B) Intestinal damage quantification (intestinal villus length). 5 animals per group (n=3). (C) Staining of lysozyme in representative crypts of small intestine sections of animals treated with 17AAG or vehicle alone (NT) and sacrificed at day 7 post-hematopoietic stem cell transplantation. Control: non-grafted, non-

irradiated mice. Magnification x10. **(D)** Median of lysozyme positive cells per crypt. Cells were counted from ten different crypts per animal (n=5 animals). **(E)** mRNA from small intestinal samples of BM and Allo mice described in (A), treated or not with 17AAG for 7 days, were subjected to qRT-PCR (4 animals per group). The expression level of defensins and lysozyme mRNA were quantified after normalizing against *GAPDH*. Bars: mean \pm SD from three independent experiments. * $p<0.05$. ** $p<0.005$.

Fig 6. 17AAG treatment *in vivo* protects intestinal stem cell niche **(A)** mRNA from small intestinal samples of BM or Allo transplanted mice (described in Fig 4A), treated or not (vehicle alone) with 17AAG for 7 days, were subjected to qRT-PCR (n=3). The expression level of OLFM4 and Lgr5 mRNA was quantified after normalizing against *GAPDH*. Bars: mean \pm SD from three independent experiments. * $p<0.05$. **(B, C)** Expression of Lgr5-eGFP positive cells in crypts of small intestine sections of animals (5 mice per group). Lethally irradiated (9 Gy) Lgr5-eGFP⁺ mice were transplanted with 10⁶ BM cells and 10⁷ splenic cells from FVB/N mice (Allo), treated or not with 17AAG. Animals were sacrificed at day 7 after hematopoietic stem cells transplantation and small intestine sections were analyzed for expression of GFP. Quantifications were performed from ten different crypts per animal (5 animals per group). Mean \pm SD, * $p<0.05$.



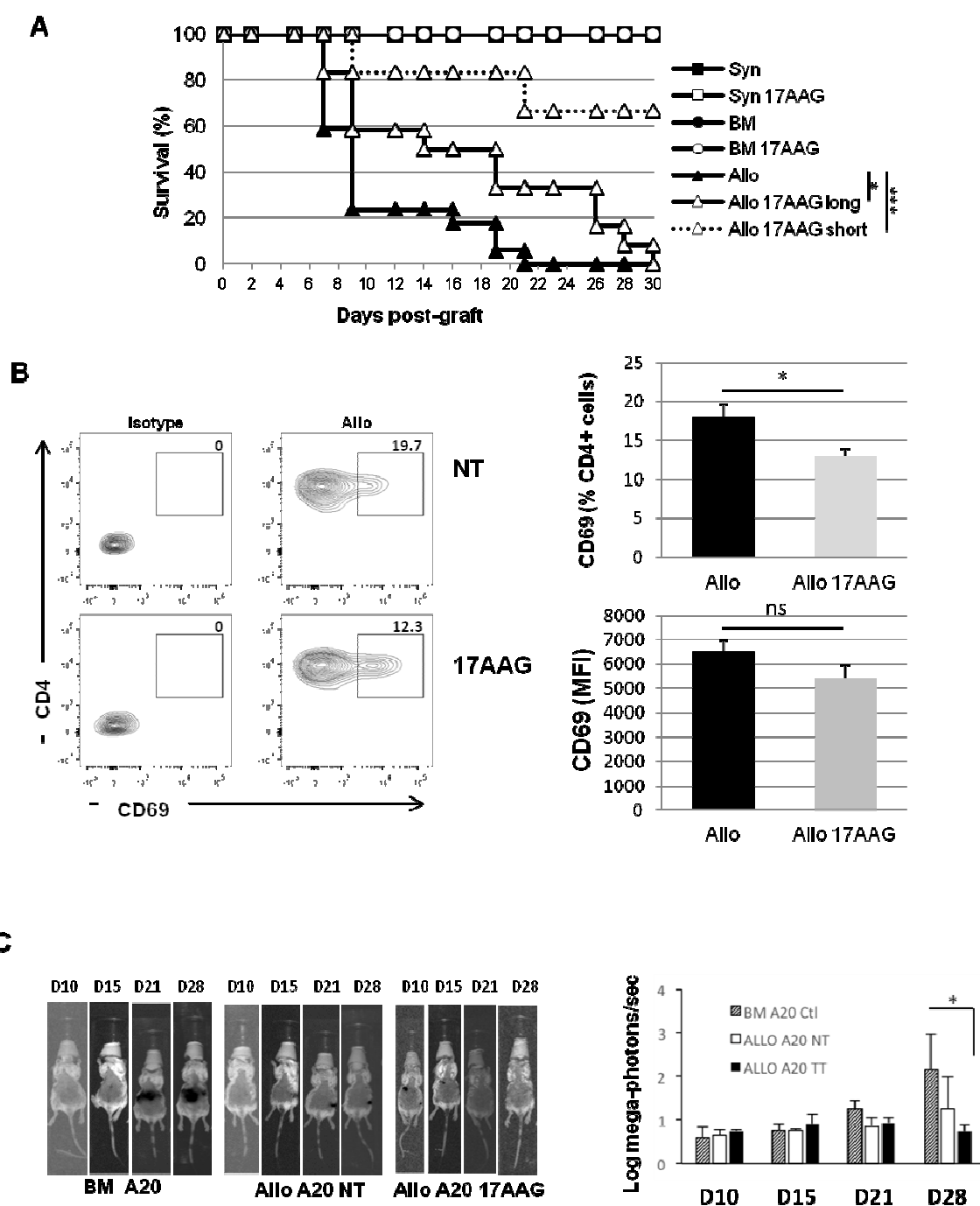


FIG 2

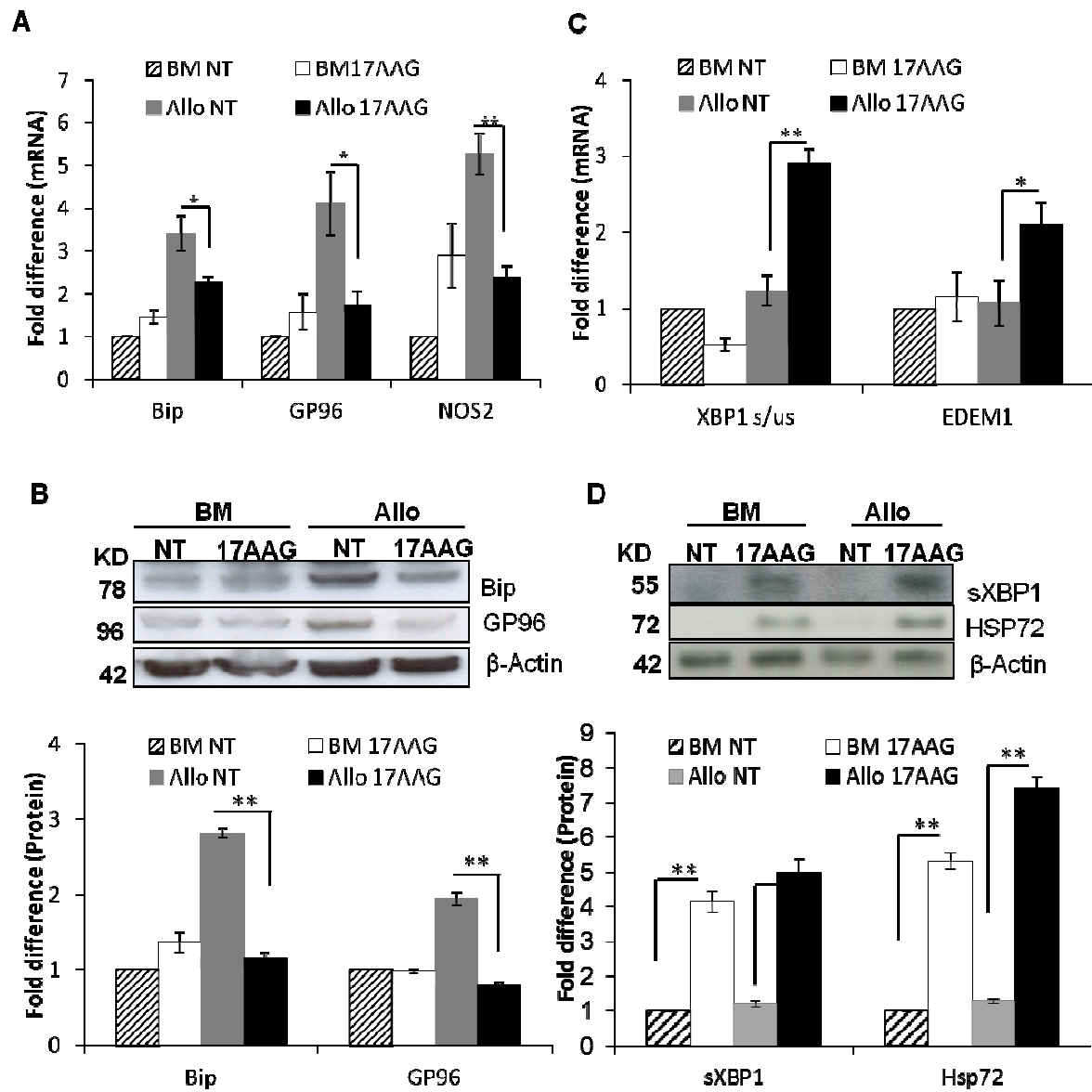


FIG 3

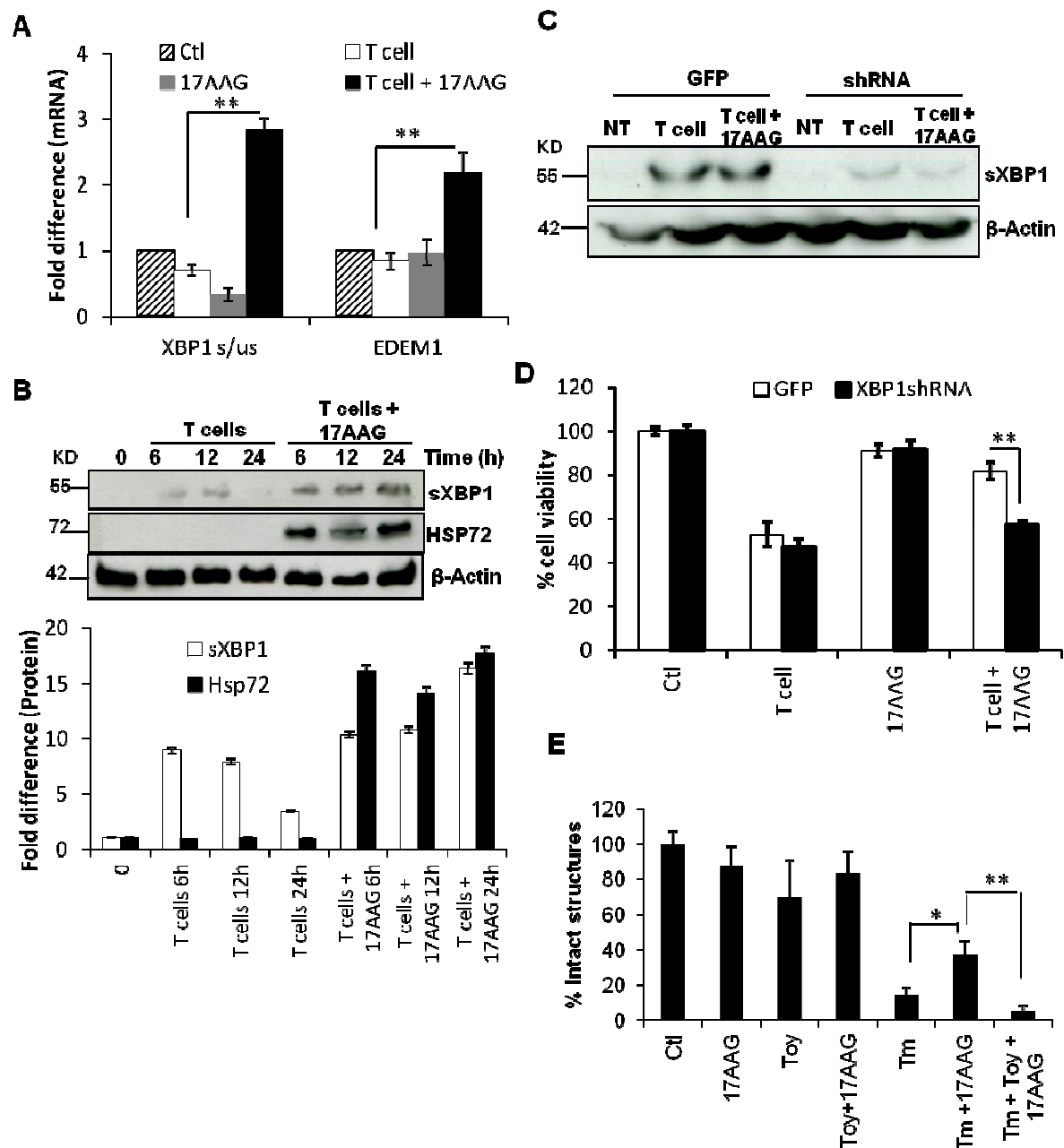


FIG 4

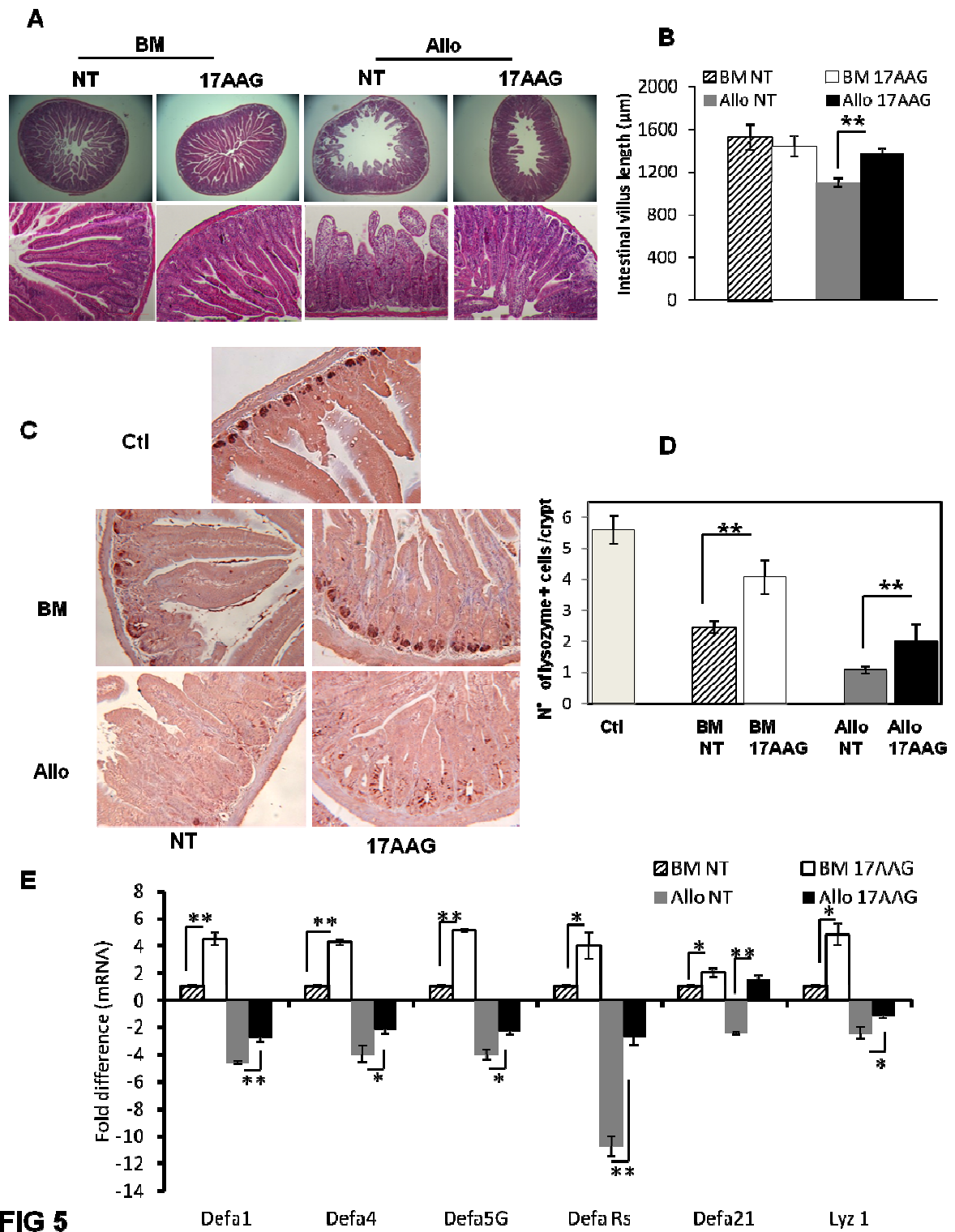


FIG 5

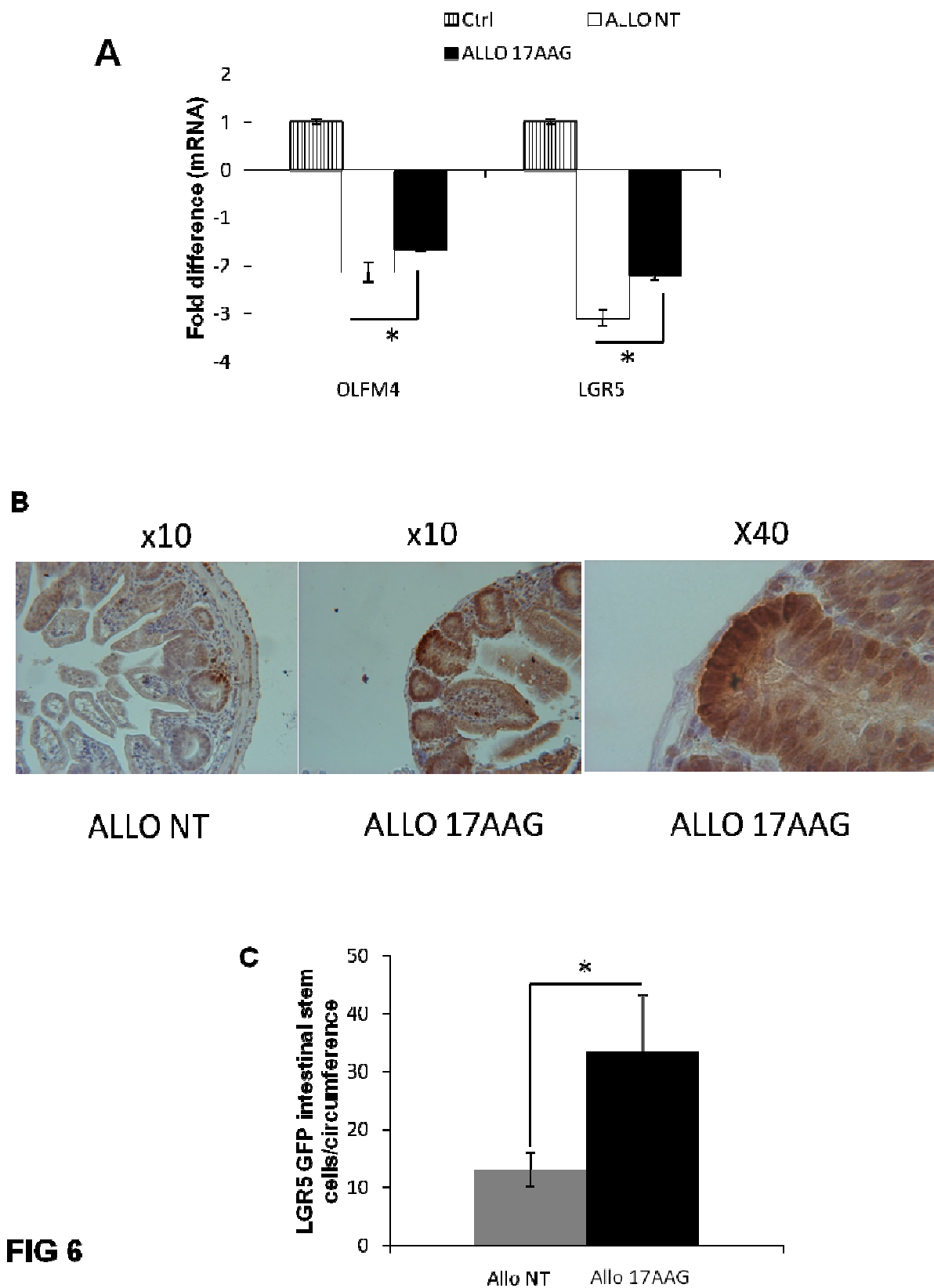


FIG 6

Legends to Supplementary figures

Supplementary Fig 1: (A) Effect of different doses of 17AAG on IEC 4.1 cell viability (BrdU-ELISA). (B) Effect of different doses of 17AAG on HSP72 mRNA expression in IEC 4.1 cells (qRT-PCR) (C) Effect of 17AAG (0.2 μ M and 0.05 μ M, 48h) on CD8a⁺ T cells viability (left panel) and activation (right panel), determined by FACS analysis. Average and error bars represent mean \pm SD from three independent experiments.

Supplementary Fig 2: Weight loss of Allo mice, treated or untreated (vehicle alone) with 17AAG (Fig 1A). Results are expressed as percentages of initial weight from day 3 to day 9 post-graft. After day 9, the low number of surviving mice in the untreated group (4/18) did not allow further analysis.

Supplementary Fig 3: (A) Dose-dependent effect of 17AAG on T cell proliferation from control mice (spleen) according to Cell Trace dilution after 5 days culture in activation conditions with CD3/CD28 Dynabeads and 100 U/ml mouse recombinant IL-2. (B) Percentages of cell death (Annexin V⁺ 7AAD⁺) among activated T-cells (CD3⁺ CD69⁺) treated with 17AAG (2 days, 10 μ M). (C) Flow cytometry analysis of intracellular CD4⁺ T cell staining of IFN γ , treated or not (vehicle alone) with 17AAG (2 days, 5 μ M). (D) Western blot analysis of phosphorylated AKT and ERK1/2 in T cells either left untreated (vehicle alone) or incubated with 17AAG (10 μ M) before activation for 1 hour. (Results presented are representative of at least 3 distinct experiments.)

Supplementary Fig 4: 17AAG treatment does not impair hematopoietic reconstitution. (A) Percentages of myeloid progenitors in bone marrow from animals sacrificed one-month post-hematopoietic stem cell transplantation, daily treated or not for 7 days with 17AAG: LK (multipotent progenitors), CMP (common myeloid progenitors), GMP (granulo-monocytic progenitors) and MEP (megakaryocyte-erythrocytes progenitors). (B) Differentiated cells isolated from the spleens of the

animals. Results, presented as mean \pm SD, 4 animals per group, are representative of 2 distinct experiments.

Supplementary Fig 5: Survival curves of BALB/c Syn mice transplanted with 10^6 BM cells and 10^7 splenic cells from BALB/c mice, challenged with A20 cells (50 000) and treated with 17AAG (10 mg/kg) or not (vehicle alone) daily for 7 days (6 animals per group). Survival curves were analyzed using Mantel-Cox test. * $p < 0.05$.

Supplementary Fig 6: mRNA from small intestinal samples of mice transplanted with an allogeneic graft composed of BM cells only (BM) or BM cells and splenic cells (Allo) and treated or not (vehicle alone) with 17AAG for 7 days was subjected to qRT-PCR (n=3). The expression level of IL-22 mRNA was quantified after normalizing against *GAPDH*. Bars: mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.005$.

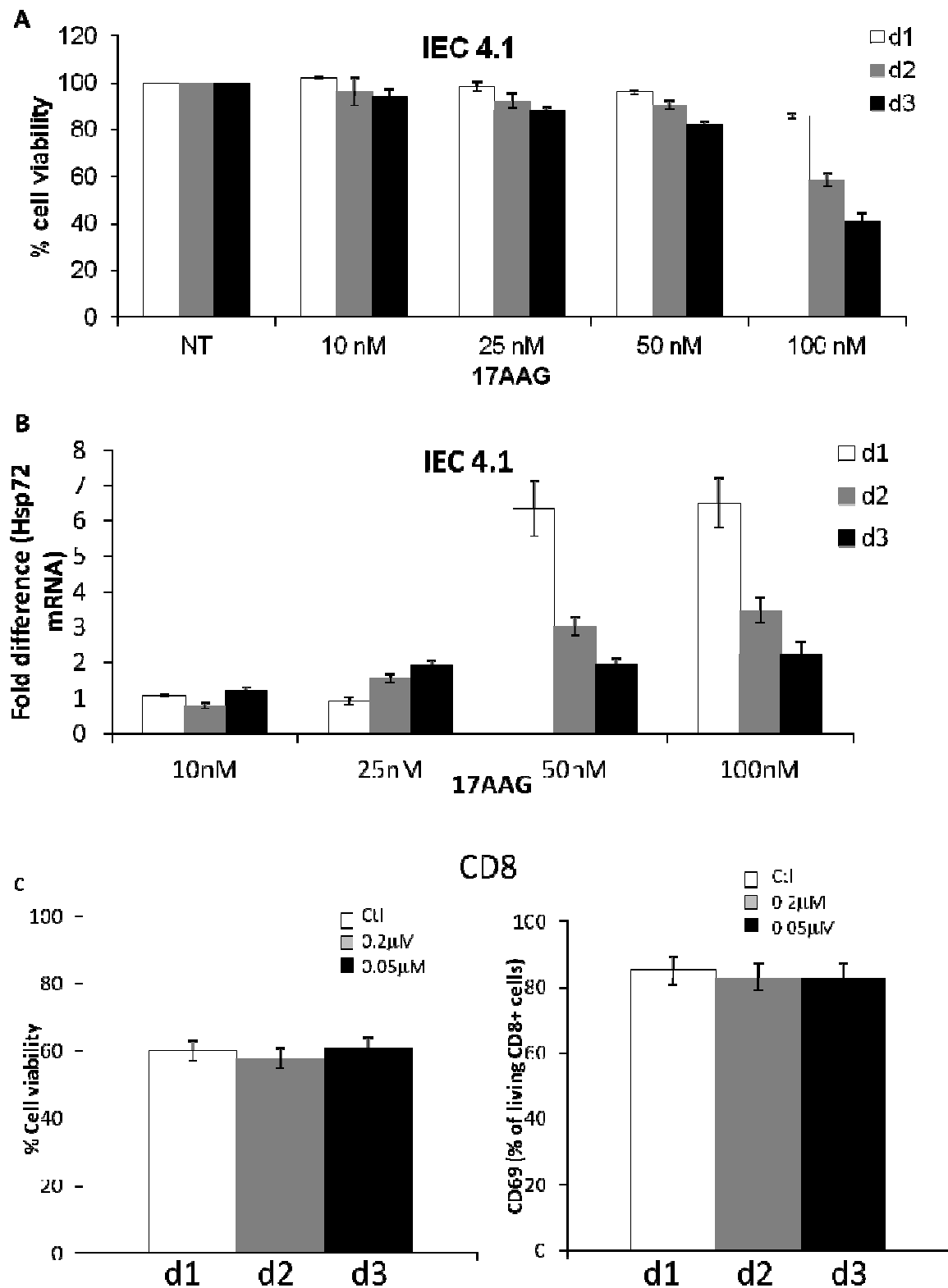


FIG S1

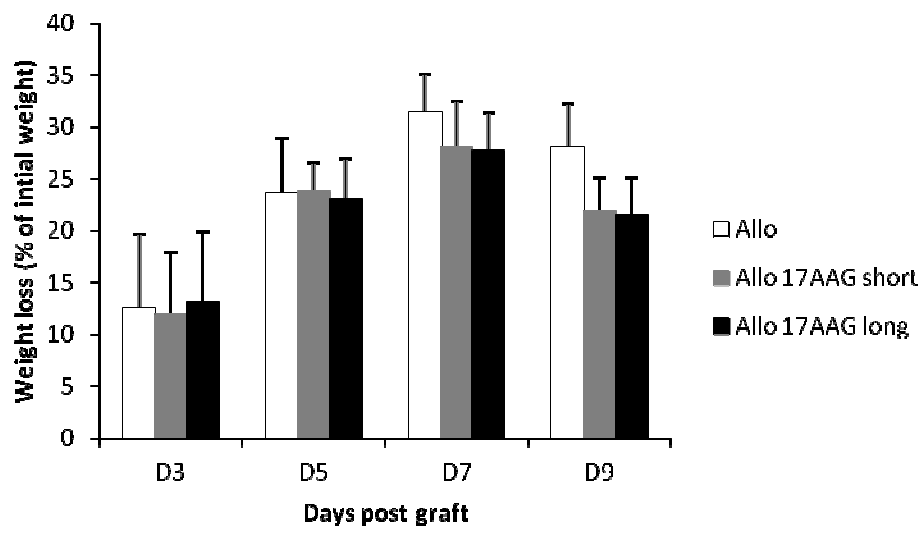


FIG S2

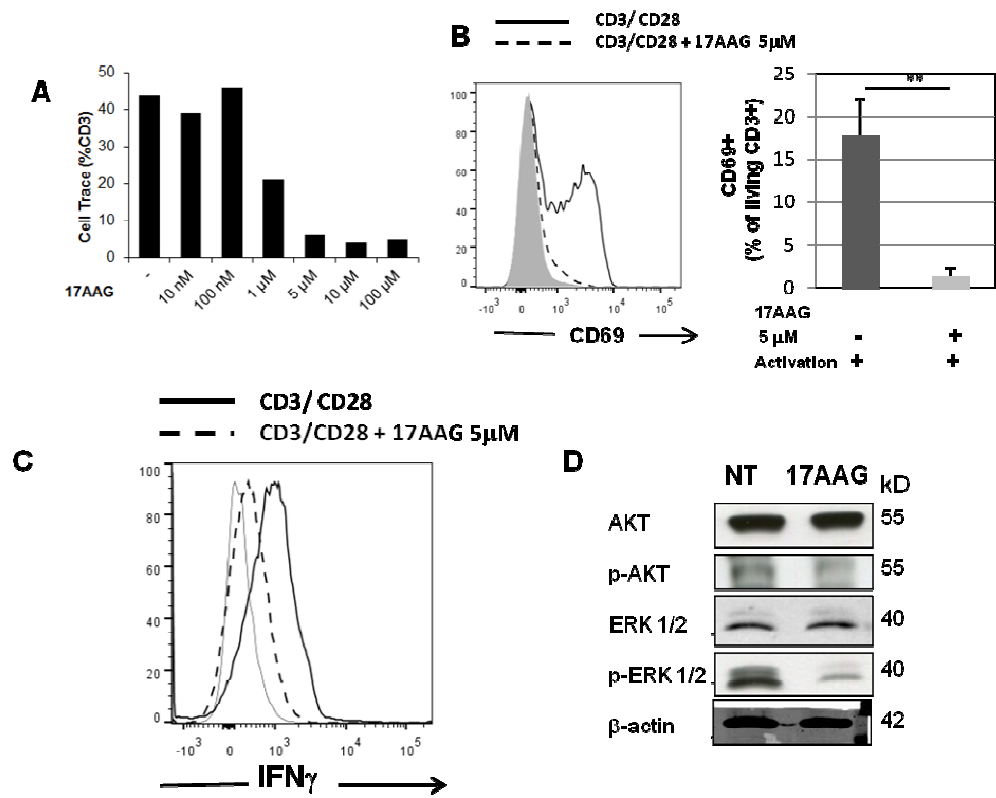


FIG S3

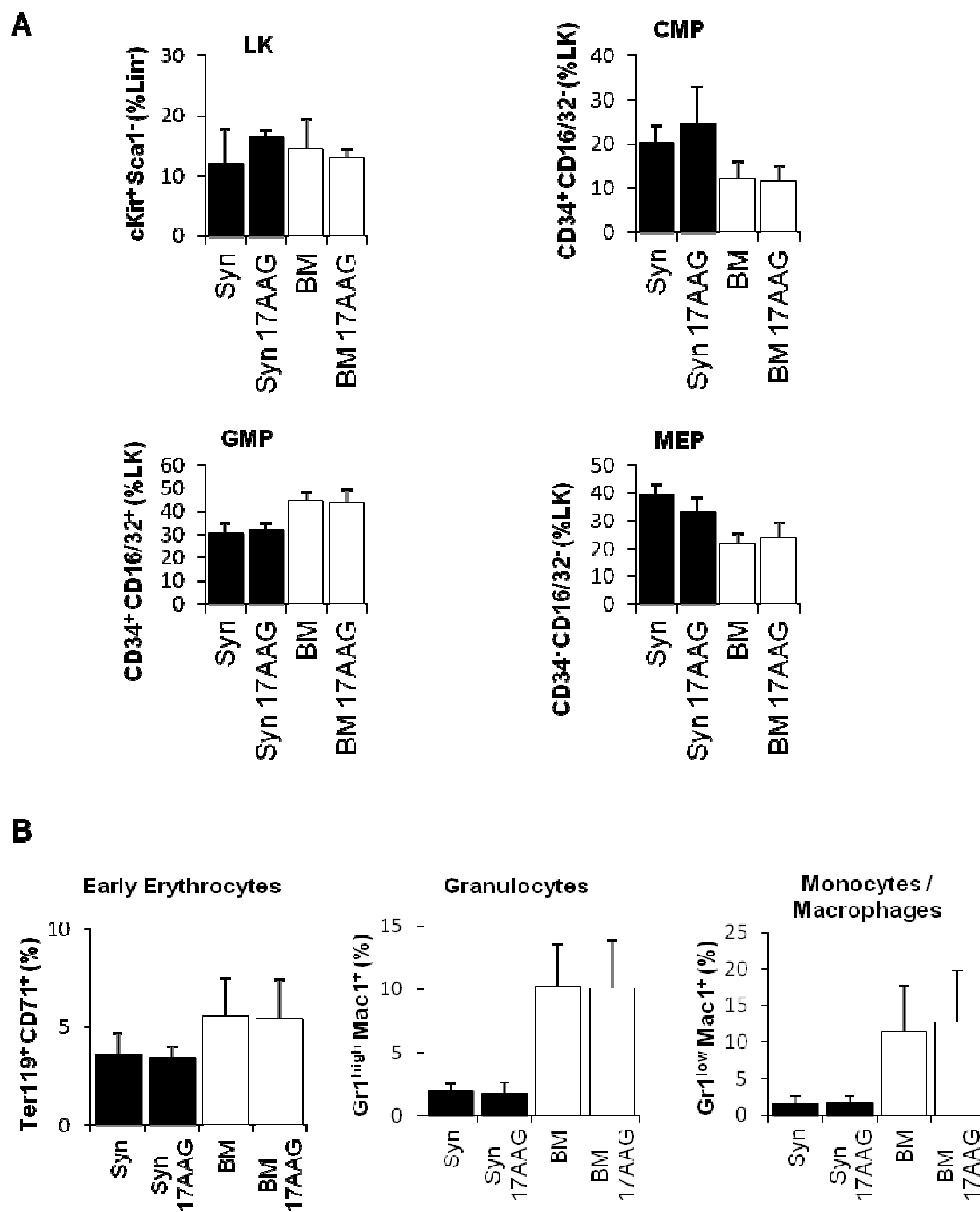


FIG S4

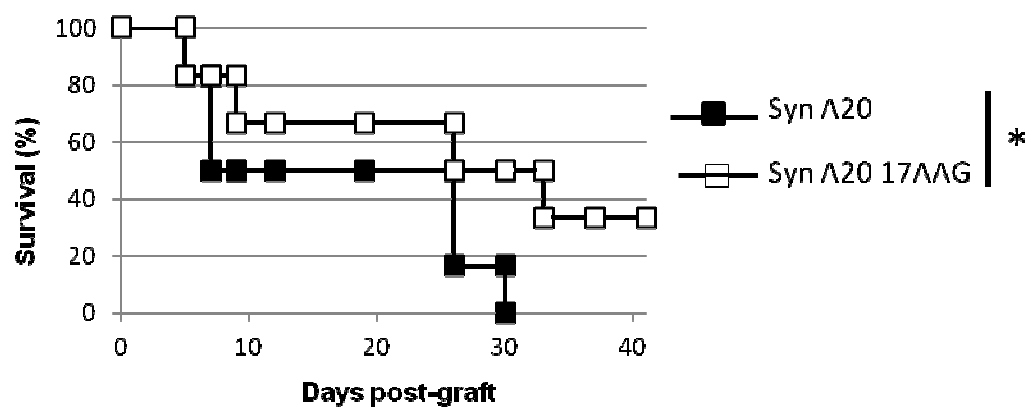


FIG S5

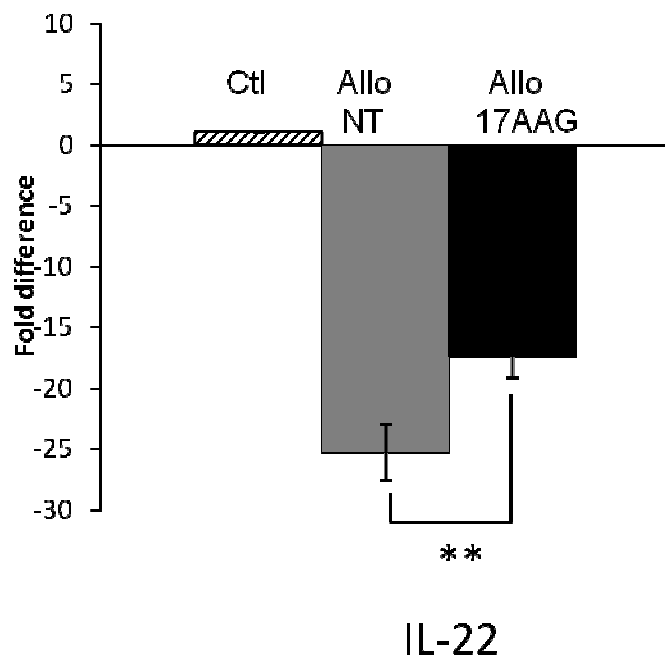


FIG S6

Conclusion

HSP90 est impliquée dans de multiples processus essentiels, telles la survie, la différenciation, la prolifération et l'apoptose, altérées dans les cellules tumorales (Pelicano et al., 2006). Le mécanisme qui décrit comment la 17AAG fonctionne différemment sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales n'est pas élucidé. Il induit la mort des cellules cancéreuses et pourtant entraîne une forte surexpression d'HSP72, dont l'effet sur les cellules est protecteur.

Nos travaux montrent que, dans le modèle murin de GvH aiguë, la 17AAG diminue la mortalité due à la GvH sans réduire l'effet GvL. La 17AAG inhibe les lymphocytes T *in vitro* et *in vivo*, bien que de peu dans ce dernier cas, peut-être parce qu'utilisée à une dose trop faible pour cet effet. La fonction protectrice semble en effet pour grande partie due au fait que, à la dose utilisée, la 17AAG favorise l'UPR dans les cellules de Paneth, comme le montre l'activation de XBP-1, assurant leur survie par maintien de leur homéostasie. Leurs fonctions protectrices sur l'intestin sont donc conservées, comme le montrent la production restaurée d' α -défensines, l'aspect histologique et la restauration des cellules souches intestinales.

Il a été documenté que la 17AAG atténue la colite, aiguë et chronique, par augmentation de la réponse Treg (Collins et al., 2013). Cette publication ouvre la voie à la recherche sur l'utilisation des inhibiteurs de HSP90 dans les MICI. L'effet protecteur dans la GvH pourrait donc être double. Il reste à rechercher si l'effet positif sur les Treg a lieu dans le développement de la GvH. Notre étude montre que la 17AAG atténue la GvH en maintenant l'homéostasie dans les cellules de Paneth, donc en favorisant leur survie et, par conséquent, leurs fonctions protectrices. La 17AAG, déjà testée comme molécule anticancéreuse dans des essais cliniques, ou d'autres inhibiteurs des HSP90 plus récents méritent d'être aussi étudiés pour la prévention de la GvH.

Extracellular Gp96 is a chaperone of complement C3 and a serum marker of severity in graft versus host disease

L'alloCH est un traitement curatif utilisé dans certaines maladies, notamment les hémopathies malignes, mais dont le succès est limité par la GvH. La GvH, qui consiste en la destruction des tissus du receveur par les lymphocytes T du donneur après leur activation par des CPA, est initiée et aggravée par la libération massive de signaux de danger. Le diagnostic de la GvH est difficile et ne comprend aucun biomarqueur standardisé. Parmi d'autres candidats, les signaux de danger sont actuellement envisagés comme biomarqueurs potentiels.

Les HSP sont une superfamille de chaperons moléculaires dont certains membres peuvent être sécrétés en cas de stress et exercer la fonction de signaux de danger. Ils n'ont pas encore été étudiés comme biomarqueurs de la GvH. En particulier, Gp96 est le membre du RE de la famille des HSP90, où elle participe à la bonne conformation de certaines protéines et est capable de lier des peptides ; elle est surexprimée et peut être sécrétée en cas de stress. Elle joue un rôle dans l'immunité innée, comme signal de danger, et dans l'immunité adaptative, comme adjuvant des peptides qu'elle chaperonne.

Dans ce travail, nous montrons que la concentration de Gp96 est augmentée dans des sérums de patients développant une GvH aiguë sévère. Nous confirmons que la GvH aiguë induit l'augmentation de la concentration sérique de Gp96 dans un modèle murin, où nous montrons que Gp96 interagit avec C3. Enfin, nous analysons cette interaction par double-hybride, expériences *in vivo* avec des souris C3^{-/-} et divers tests *in vitro* et *ex vivo*.

Extracellular Gp96 is a chaperone of complement C3 and a serum marker of severity in graft versus host disease

A Seignez\$, AL Joly\$, A Hazoumé, M Maëstrali, M Sanka, K Chaumonnot, G Jégo, A Gouloudina, G Marcion, R Seigneunic, A Hammann, P Ducoroy, P Delarue, P Senet, E Solary, MT Rubio, O Hermine, E Kohli*, C Garrido*

Abstract

Better identification of severe acute graft versus host disease (GvHD) may improve the outcome of this life-threatening complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. GvHD induces tissue damage and the release of damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules. Here, we demonstrate that the serum level of heat shock protein Gp96 (glucosa-regulated protein 96), which has immuno-modulatory properties when released from damaged cells, could be such a DAMP. We demonstrate that the serum level of Gp96 increases as gastro-intestinal GvHD develops and its level correlates with disease severity. Such an increase in Gp96 serum level was also observed in a mouse model of acute GvHD. This model was used to identify complement C3 as a main partner of Gp96 in the serum. Gp96 binds to a complement C3 fragment encompassing amino acids 749 to 954, which is common to C3b and iC3b. *In vitro* experiments with purified proteins demonstrate that Gp96 down regulates several complement C3 functions. Finally, experimental induction of GvHD in C3 deficient mice confirms the link between Gp96 and C3 in the serum and with the severity of the disease. In conclusion, our data show that Gp96 serum levels could be used as a marker of GvHD severity.

Introduction

Endogenous noninfectious molecules, including intracellular proteins and nucleic acids, are part of the damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules, also called alarmins, that are released by stressed tissues and act as endogenous danger signals to promote inflammatory and immune responses. In the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, such molecules can be released during the conditioning regimen and activate host antigen-presenting cells that, in turn, stimulate and polarize donor T cells, which can lead to acute graft-versus-host disease (GvHD), the major complication of this therapeutic approach (Ramadan and Paczesny, 2015; Wingard et al., 2011). Acute GvHD is the result of alloreactive donor T cells attacking host tissues (mainly gastrointestinal tract, skin and liver (Ferrara et al., 2009)). DAMP molecules released by these damaged tissues perpetuate and amplify the acute GvHD (Ferrara et al., 2011; Ramadan and Paczesny, 2015).

Heat shock proteins (Hsps) are a family of conserved, ubiquitously-expressed chaperones involved in the proper folding, assembly and turn-over of various proteins (Garrido and Solary, 2003). Hsps are constitutively present in various cells and their expression increases in a cytoprotective response to environmental stress. Hsps were involved in acute GvHD pathogenesis, i.e. Hsp70 protein expression was associated with skin damage in an *in vitro*-generated GvHD reaction in human skin (Jarvis et al., 2003), whereas Hsp90, whose expression increases in activated T cells, was proposed as a target for selective depletion of alloreactive T cells (Joly, in press and (Stuehler et al., 2009)).

Some Hsps are released during cell stress and injury and behave as DAMPs (Tsan and Gao, 2009). One of these Hsps is Glucosa-regulated protein Gp96 (encoded by *HSP90B1*), known also as GRP94 or tumor rejection antigen 1, which is a paralog of HSP90 in the endoplasmic reticulum. Gp96 intracellular level rises during stress conditions such as inflammation, hypoxia or glucose starvation (Yang and Li, 2005). Gp96 binds and hydrolyzes ATP, is the most abundant protein in the RE and is ubiquitously expressed in all nucleated cells. Intracellular Gp96 acts as a molecular chaperone able to favor proteins folding and either protect or inactivate bound proteins (Zhang et al., 2015). Under certain stress conditions, Gp96 is also found outside the cells and on the membrane of some immune cells. Gp96 extracellular functions strongly suggest that once exiting the cell Gp96 may behave as a

DAMP molecule (Ochayon et al., 2013) . Extracellular Gp96 increases specific immune response by loading peptides onto MHC molecules and facilitating antigen presentation to T cells (Doody et al., 2004; Suto and Srivastava, 1995) . Gp96 also promotes innate immune response activation by pro-inflammatory cytokine/chemokines (Pawaria and Binder, 2011; Singh-Jasuja et al., 2000a).

Here, we show that Gp96 serum level increases as GvHD develops in patients receiving hematopoietic stem cells transplantation as well as in a mouse model of acute GvHD. We demonstrate that, in the serum, Gp96 binds to and chaperones complement C3 fraction, a central functional hub that largely drives the activation, amplification and effector generation of the complement response.

Material and Methods

Mice and acute GvHD models

BALB/c (H-2^d), FvB/N (H-2^q), C57BL/6 wild type (wt) and C3^{-/-} (H-2^b) female mice, between 7 and 10 weeks old, were purchased from Charles River (France).

The day before the hematopoietic stem cell transplantation, recipients were lethally irradiated (9 Gy). At D0, grafts were prepared from tibias and femurs bone marrow (for hematopoietic stem cells), and spleen (for mature T lymphocytes) of donor animals. Cells were injected retro-orbitally to irradiated recipients. Mice received either a syngeneic graft (Syn, 10⁶ bone marrow cells and 10⁷ splenocytes from haplotype-identical mice), or a bone marrow allogeneic graft (BM, 10⁶ bone marrow cells from haplotype-different mice), or a bone marrow + spleen, allogeneic graft (Allo, 10⁶ bone marrow cells and 10⁷ splenocytes from haplotype-different mice). For experiments with C3^{-/-} mice, 2.10⁶ splenocytes were injected in order to better see differences in survival. The survival was followed. In some experiments, sera and/or spleen were sampled at different days post-graft. The ethic committee of the Burgundy University approved all animal protocols.

Human sera

Patients

12 patients who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with bone marrow or peripheral stem cell grafts following myeloablative conditioning between January 2010 and January 2012 in Saint Antoine Hospital in Paris entered the study. All patients provided an informed consent for biological research purposes. The study was conducted according to the procedures of the Declaration of Helsinki and the local ethic committee rules. Diagnosis and grading of acute GvHD was performed as described (Przepiorka et al., 1995).

For some complement experiments, sera were sampled from healthy volunteers of various ages who gave previously their informed consent. For cleavage experiments, normal human serum (Sigma, France) was used.

Gp96 ELISA in patients' sera

Sera from patients were diluted ten times and analyzed using HSP90b1 ELISA kit (Euromedex, France) accordingly to the manufacturer's instructions. All the sera available for a patient were processed in the same experiment.

Human purified C3 fragments and human Gp96 recombinant protein

Human purified C3 fragments from CompTech, (Texas, USA) and human Gp96 recombinant protein produced in the human cell line HEK293 (BioVendor, Czech Republic) were used. PBS or bovine serum albumin in the same buffer than recombinant Gp96 were used as negative controls.

Flow cytometry

Spleens were removed at day 7 post-graft and splenocytes were stained with anti-mouse F4/80 (Biolegend, the Netherlands) and anti-Gp96 (Enzo Life Science, France) or anti-CD3 (Biolegend, the Netherlands) and anti-CD69 (eBioscience, France) antibodies. Acquisition was performed on LSR II cytometer (BD Biosciences, France). For phagocytosis experiment (see below), macrophages were gated on FCS/SSC and fluorescence was detected at 488 nm.

Western-blotting, immunoprecipitation

Expression of Gp96 and complement C3 in mice's sera was evaluated using polyclonal anti-Gp96 (Enzo Life Science, France) and anti-C3 (HyCult Biotech, the Netherlands) as primary antibodies. In some experiments, canine recombinant Gp96 and human recombinant Hsp90 (Enzo Life Science, France) were used as controls. Fragments of C3 were identified using anti-C3d (Dako, France) and anti-C3c antibody (Dako, France). Secondary antibodies were all from Jackson ImmunoResearch (USA).

For immunoprecipitation experiments, serum samples were depleted from endogenous antibodies by pre-cleaning with a mix of protein A and G-coupled agarose beads (Millipore, France). Equal contents in proteins according to the Lowry assay were incubated with Exactacruz B beads (Santa Cruz Biotechnology, Germany) previously coated with anti-Gp96 antibody (Enzo Life Science,

France). Anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Germany) was used as a non relevant immunoglobulin.

Proteomic analysis

Non specific staining of electrophorated proteins was done using a Coomassie brilliant blue solution. Bands of interest were sampled. Proteins were digested in gel by trypsin at 37 °C overnight. Peptides were extracted and analyzed by MS/MS as described previously (Pflieger et al., 2006).

Yeast two-hybrid assay

Vectors pGBKT7 and pGADT7 were used as bait and prey vectors respectively (Clontech, France). Complement C3 and Gp96 coding plasmids were purchased from the Mammalian Genome Collection (LGC Standards, France). Corresponding coding sequence of following fragments of C3 were cloned: C3 (25-666), C3 (749-1663), C3 (749-1303), C3 (1321-1663), C3 (749-954) and C3 (955-1303) into *NdeI/NcoI* sites of the pGADT7 vector. Coding sequence of full length (Gp96 FL) and deletion mutant of Gp96 (Gp96 ABD Ca²⁺, Gp96 Ca²⁺ PBD and Gp96 PBD) were cloned into *NdeI/BamHI* sites of the pGBKT7 vector. pGADT7-SV40, which codes for the GAL4 activation domain fused with SV40 large T antigen, was used as a positive control prey plasmid; empty pGADT7 was used as a negative control prey vector. All pGADT7- and pGBKT7-derived vectors were transformed into Y187 and Y2HGold yeast strains respectively, using Clontech Yeastmaker yeast transformation system #2 (Clontech, France). The transformants were respectively selected on Leu- and Trp-minimal media plates after growth at 30°C for 3 to 5 days. Each prey strain was mated with the corresponding bait strain to generate diploid yeast cells (Clontech Matchmaker gold yeast 2-hybrid system). Diploid yeast cells selected on Leu-Trp-minimal media plates were then patched onto Leu-Trp-minimal media plates with X- α -galactosidase at 40 μ g/ml and aureobasidin A at 70 ng/ml. Blue diploid cells appeared after 3 to 5 days at 30 °C, indicating the interaction between bait protein and prey one. Patching the positive diploid yeast cells onto higher stringency His-Ade-Leu-Trp-minimal media plates supplemented with X- α -galactosidase at 40 μ g/ml and aureobasidin A at 70 ng/ml were used to confirm the results.

C3b and iC3b cleavage

Human purified C3b was incubated at 37 °C with normal human serum previously heated at 56 °C during 30 min to inactivate complement, and with or without factor I and factor H (CompTech, Texas, USA); Gp96 or control was added. The mixture was then denatured and western-blotted. To analyze the cleavage of C3b, the quotient of α 1-dg-chain (representing iC3b) intensity by α' -chain (representing C3b) intensity was calculated.

Classical and alternative complement pathways

Healthy volunteers' sera were incubated at 37 °C for 1 h with Gp96 or PBS. For the classical pathway assay, the mixture was added to standardized sheep erythrocytes coated with antibodies (Delta Biologicals, Arizona, USA) for 1 h at 37 °C. For the alternative pathway assay, the mixture was added to $30 \cdot 10^6$ rabbit erythrocytes in gelatin veronal buffer (without calcium and magnesium) containing 13 mM of Mg/EGTA to inhibit the classical pathway (all from CompTech, Texas, USA), for 30 min at 37 °C. Cells were centrifuged and the absorbance of the supernatants was read at 405 nm.

Opsonophagocytosis

Opsonization

Alexa Fluor (AF) 488-conjugated *Escherichia coli* bioparticles (Life Technology, France) were pre-incubated with a healthy donor's serum with Gp96 or BSA in X-VIVO 15 medium, for 30 min at 37 °C. In some experiments, this pre-incubation step lasted 1 h and Gp96 was added either immediately or after 30 min.

Purification of human macrophages and phagocytosis

Buffy coats were obtained from voluntary donors *via* l'Établissement français du Sang (Besançon, France). Peripheral blood mononuclear cells were separated using Ficoll and harvested in X-VIVO 15 medium (Ozyme, France) with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, alias CSF-1, Miltenyi Biotec, France) at 100 ng/ml for three days. AF488-conjugated bioparticles were opsonized as described above. The mixture was then washed twice to remove serum and incubated with

400,000 human macrophages. After 1h, macrophages were washed in cold PBS, extracellular fluorochromes quenched by trypan blue and fluorescence was analyzed.

Release of tagged C3 from bioparticles

To investigate C3 opsonization, we used a previously reported method (Gordon et al., 1988). Opsonized bioparticles were washed three times in PBS with 1 % of sodium dodecylsulfate (SDS) to remove any non-covalently associated C3. Pellets were then resuspended in hydroxylamine 1 M with 1 % of SDS, pH 9, and incubated at 37 °C for 1 h, so that ester bonds were disrupted and C3 fragments released. Supernatants were denatured and western-blotted.

C3 staining on opsonized bioparticles

AF488-conjugated bioparticles were opsonized as described above and washed twice in PBS, then fixed in paraformaldehyde 4 % for 10 min at 4 °C, briefly washed in TBS (Tris buffer saline), saturated by 3 % BSA in TBS and targeted by anti-C3d antibody (Dako, France) at 1/200 in TBS-BSA 3 % overnight at 4 °C. After washing, particles were incubated with AF568 anti-rabbit antibody (Life Technologies, France) at 1/2000 for 30 min at room temperature, washed six times and mounted in Fluoromount (Sigma, France). Fluorescence was observed and analyzed on a Axio Imager 2 microscope (Zeiss, France); for each particle, AF568-fluorescence intensity was quantified on ImageJ®.

Statistical analysis

The paired t-test was used for hemolysis comparison, phagocytosis experiments and Gp96 quantification in patients' sera. Otherwise, for comparison tests, the t-test was used when variances were equivalent according to the F-test, the Mann-Whitney test when not. The tests were executed on GraphPad Prism 5. Differences were considered as significant for $p < 0.05$.

Results

Gp96 level increases in the sera of patients developing acute GvHD.

We first quantified Gp96 by ELISA in the sera of patients with acute GvHD (gastro-intestinal (GI) and/or skin GvHD). We found that Gp96 concentration in the serum started increasing at the time of clinical diagnosis of GvHD, compared to levels observed on day 7 before the diagnosis, and peaked at day 7 after onset (Fig 1A). As GI GvHD is the worst form of the disease leading to an increase of the morbidity and mortality, we determined Gp96 levels in grade II and grade III-IV intestinal GvHD patients. Interestingly, in the most severe forms of GvHD (grade III-IV) this increase was more important when compared with less severe forms (Fig 1B). In contrast to these results, no changes in Gp96 levels were observed in patients where isolated skin GvHD was diagnosed (Fig 1C). We concluded that Gp96 might be a marker of GvHD severity.

Gp96 increases in the sera of mice developing acute GvHD.

We next used a mouse model of acute GvHD reproducing all the signs of GI GvHD (Fig 2A and Joly, in press). Recipient BALB/c animals were irradiated before bone marrow + spleen-derived T cells transplantation from allogenic C57BL/6 animals (Allo group). As controls that do not develop the GvHD, we used animals transplanted with only bone marrow cells (BM group) or with bone marrow + spleen-derived T cells from syngeneic animals (Syn group). As expected, BM and Syn animals did not develop a GvHD, while the Allo group developed the disease (all animals of the Allo group died around 15 days post-graft (Fig 2B)). Gp96 was assessed in the sera from mice by western blotting. The results showed that Gp96 but not Hsp90, a cytosolic member of the Hsp90 family, was increased at day 7 in the sera from mice developing a GvHD. No increase was observed in the control Syn and BM mice that did not develop the disease (Figure 2C). We then analyzed Gp96 increase at different times post-transplantation and demonstrated that Gp96 levels peaked at day 7 in the sera of the Allo mice (Figure 2D). In addition, we found that Gp96 was also overexpressed 7 days after hematopoietic stem cell transplantation at the membrane of splenic F4/80⁺ cells isolated from Allo mice compared to BM and Syn mice (Figure 2E).

Gp96 binds to complement C3 in the serum during GvHD.

To identify Gp96 associated proteins in the serum during GvHD development, we immunoprecipitated Gp96 from mice's sera (Fig 3A) and identified the bound proteins after SDS-PAGE by comparing bands between Allo mice developing GvHD and control groups (mice receiving a syngeneic graft – Syn- and non grafted mice). Three bands were repetitively observed exclusively in the sera of animals developing the GvHD (Allo mice) (Fig 3B). Analysis of those bands by mass spectrometry revealed that all three corresponded to the complement C3 (Suppl Fig 1). We concluded that complement C3 is a partner of Gp96 in GvHD. The fact that complement C3's bands were hardly present in the control groups that do not develop GvHD or when using a non relevant antibody attests the specificity of the results obtained. The complement cascade is known to be activated by DAMPs in response to any type of tissue damage, complement effector molecules causing additional tissue damage that fuel a vicious cycle. Therefore, we further explored the consequences of Gp96 interaction with C3 protein.

Full length Gp96 binds to the 749-954 amino-acid fragment of complement C3.

Using a yeast two-hybrid system, we first sought to provide additional evidence for the biochemical interaction of Gp96 with complement C3. Blue diploid transformants could be detected on a high stringency minimal medium, indicating a direct interaction between Gp96 and complement C3.

To map the domains of Gp96 and complement C3 involved in their association, we used different C3 fragments and Gp96 deletion mutants. Figure 4A represents the full-length complement C3 and the C3 fragments tested. We found that Gp96 interacted with the α' -chain of complement C3. More precisely, a region between amino acids 749 and 954 was the minimal fragment required for this interaction (Fig 4B). It is worth to note that this minimal fragment is common to C3, its opsonic fragment C3b, and the cleavage fragment of C3b known as iC3b (Fig 4A and Suppl Fig 2). Next, we cloned either full-length Gp96 or deletion mutants lacking one of the main structural domains of Gp96, either the ATP-binding domain or peptide-binding domain with and without the calcium-binding site (charged linker domain) that regulates the chaperone activity (Fig 4C). Interestingly, none of these three deletion mutants interacted with complement C3, suggesting that the entire structure of Gp96 is required for the recognition of complement C3 (Fig 4D).

Gp96 inhibits factor I/factor H mediated cleavage of C3b

As the complement C3 region involved in the interaction with Gp96 is needed for binding to factor H, which is an important regulator of complement activity by promoting the cleavage of C3b to iC3b by factor I, we explored whether Gp96 could protect C3 from this enzymatic proteolysis. Purified human C3b was incubated with human factors I and H in the presence of serum with or without human recombinant Gp96 (LPS-free). Specific fragments of C3b and iC3 were analyzed by SDS-PAGE. C3b cleavage after 10 min and 30 min of incubation is shown in Fig 5A. We found that in the presence of Gp96, the 115 KDa α' chain of C3b was more abundant whereas the cleaved forms α 1-dg-chain (67 kDa, iC3b) and the α 2-chain (43 kDa, common to iC3b and C3c) were less abundant. We concluded that Gp96 may prevent C3b cleavage.

Gp96 inhibits opsono-phagocytosis of Escherichia coli by hampering C3 tagging of bacteria's membranes.

We then investigated the possible effect of Gp96 on phagocytosis of opsonized fluorescent *E. coli* bioparticles. C3b and iC3b are two of the most potent enhancers of cell phagocytosis. We incubated AF488-conjugated *E. coli* particles with complement C3 from serum of healthy donors in the presence or absence of human recombinant Gp96, washed and subsequently incubated the bacteria with human primary macrophages. As shown in Fig 5B, phagocytosis was dramatically inhibited when the particles were opsonized in the presence of Gp96. By immunoblot (Fig 5C), we showed, when opsonization was performed in the presence of Gp96, a decrease in the amount of C3 deposited on bacteria, but not of C4, used here as a control. This suggests that Gp96 inhibits C3b deposition at the surface of bacteria rather than the phagocytosis of opsonized bacteria. This result was confirmed by quantification of C3b on bacteria by microscopy after C3 A568-staining (Fig 5D). Further confirming this result, we did not observe any inhibition of phagocytosis when Gp96 was added 30 min after incubation of the bioparticles with complement C3 (Suppl. Fig. 3), further suggesting that Gp96 acts by inhibiting opsonisation and not the subsequent phagocytosis of C3-tagged bacteria by macrophages.

Gp96 inhibits both the alternative and the classical pathway of complement C3 activation in human serum.

Initiation of the complement response by any activation route, either the classical or the alternative leads to the formation of protein complexes called C3 convertases at the surface of the recognized cell. These convertases bind and activate C3 to generate the opsonic fragment C3b. Increasing C3b deposition leads to the formation of C5 convertases (Ricklin and Lambris, 2015). The C5 convertase of the classical pathway as well the C3 and C5 convertases of the alternative pathways contain at least one C3b molecule that can bind Gp96. Therefore, we determined if Gp96 could block the membrane attack complex formation by the alternative or classical convertases using complement hemolytic assays. Our results with different healthy patients' sera demonstrate that Gp96 inhibits hemolytic activity in serum activated by both the classical and the alternative pathways (Fig 5E-F).

Gp96 serum level correlates with that of complement C3 and with GvHD severity in mice.

To confirm *in vivo* that Gp96 may be a chaperone of complement C3 associated to GvHD severity, we used complement C3 knockout animals (Gp96 knockout animals are not viable). GvHD was reported to be less severe when recipient mice were knocking out for complement C3. We first used C3^{-/-} C57BL/6 mice as recipients and wild type FvB/N mice as donors. As previously reported, recipient C3^{-/-} C57BL/6 mice developed a less severe GvHD and demonstrated a longer survival when compared to wild type C57BL/6 recipients ((Ma et al., 2012) and data not shown). As expected, C3 was not detected in the sera from C3^{-/-} recipients (Fig 6A), which, interestingly, correlated with a much lower level of Gp96 compared to wild type recipients Allo mice (Fig 6A). The correlation found between complement C3 and Gp96 serum levels acknowledges the chaperone function of Gp96. Next, we used C3^{-/-} C57BL/6 mice as donors and wild type BALB/c as recipients. Seven days after hematopoietic stem cell transplantation, Gp96 and C3 were both detected in the serum of recipient animals (Fig 6B, left panel) and the two proteins were confirmed to interact (Fig 6B, right panel). Surprisingly enough, we detected more both C3 and Gp96 in the serum of recipient Allo mice grafted with C3^{-/-} BM cells + splenocytes than in the serum of those grafted with wild type cells. Allo mice grafted with C3^{-/-} BM cells + splenocytes developed a more severe and rapidly fatal GvHD than those grafted with wild type

cells (Figure 6C). Accordingly, more activated T cells ($CD3^+CD69^+$) were detected in the spleen of Allo mice grafted with C3^{-/-} compared to wild type cells (Figure 6D). It is worth noting that in these experiments with C3 knockout mice, in order to better see differences in the mice groups' survival, fewer splenocytes were injected to induce the GvHD (see material and methods).

Altogether our results indicate that Gp96 can chaperone complement C3 in the serum during GvHD development and that it seems associated to the disease's severity.

Discussion

Tissue damage, resulting from the conditioning regimen before transplantation and from the alloreaction of donor T cells to host antigens, leads to the release of danger signals which play a critical role in the pathogenesis of GvHD, a major complication of hematopoietic stem cell transplantation. These molecules are interesting to identify as they represent both potential therapeutic targets and biomarkers (Ramadan and Paczesny, 2015). Despite the potential interest as a danger signal of Gp96 (HSP90B1), a secreted -stress-inducible- ER chaperone, its involvement in GvHD has not yet been explored. In this work, we demonstrate in patients and mice that serum levels of Gp96 increase as GvHD develop. This is an early and transient increase. For instance, in patients, the increase in Gp96 in the serum starts at the moment of its diagnosis by intestinal biopsy and peaks one week later. Moreover, the degree of this increase correlated with the severity of the disease, the strongest increase being observed in patients with grade III-IV GvHD. As heat shock proteins expression is part of a protective mechanism against adverse situations, the kinetics of Gp96 in the sera of patients and mice suggests that Gp96 increase is probably a consequence of tissue damage resulting from GvHD, which is in accordance with the fact that Gp96 levels correlate with the disease's severity.

Gp96 has been already reported to be an endogenous immunomodulator of innate immunity (pro-inflammatory), alone or bound to the LPS, and of adaptive (antigen presentation) immune responses. In rheumatoid arthritis, Gp96 has been reported to be increased in the synovial fluid and to contribute to the inflammatory response (Huang et al., 2012). Also circulating Gp96 has been reported to be increased in patients with type 1 diabetes (Pagetta et al., 2003) but its role in the disease pathogenesis has not been elucidated. In this work, we propose another function of Gp96 in GvHD through its chaperone function. Protein chaperones, such as Gp96, constitute the protein-folding machinery in the cell. Unfolded protein precursors were once thought to harbor common, structural patterns for recognition by those chaperones. However, emerging genetic and biochemical studies have demonstrated that exists precise substrate specificity for the action of chaperones. Although different intracellular specific partners of Gp96 have been reported (e.g. MHC class II molecules

(Schaiff et al., 1992), GARP -glycoprotein A repetition predominant- that controls T regulator cells function (Zhang et al., 2015) or the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex (Staron et al., 2011)) hardly anything is known about the partners of Gp96 in the extracellular medium. In this study, we used a proteomic approach to determine that a major Gp96 binding protein in the serum during GvHD is the complement C3. The mapping of this association demonstrated that a 749-954 amino-acid fragment in the α -chain of C3 was the minimal fragment able to interact with Gp96 (included in C3, C3b, iC3b and C3c). The complement represents a first line of defense against pathogens but is also now recognized as a tightly integrated surveillance and triage system playing a key role in host homeostasis (Arlet et al., 2014; de Thonel et al., 2010; Ribeil et al., 2007; Ricklin, 2012). Cleavage of C3 into C3b and C3a is the central step in the complement activation cascade. C3a is a potent mediator of inflammation (anaphylatoxin) and C3b, once attached to pathogenic or apoptotic target surfaces through its reactive thioester moiety, has major functions, notably providing a molecular platform for the formation of convertase complexes in the activation process leading to cell lysis and favouring phagocytosis *via* complement receptors on phagocytes. C3b requires a tight regulation to avoid excessive activation and protect cells from complement attack under normal conditions. Under disease conditions, tissue damage can potentially trigger the complement system and in turn, complement effector molecules can cause additional tissue damage and amplify inflammation. Therefore, it is important to determine whether Gp96 is a regulator of C3b function. Our *in vitro* experiments with purified proteins show that Gp96 inhibits several functions of complement C3: i) inactivation of C3b by factors I and H-dependent cleavage, ii) opsonization of bacteria and iii) activation of complement by both the alternative and the classical routes. These results are coherent with Gp96's function as chaperon as already reported for other heat shock proteins, which can physically block their partners' proteolytic cleavage and/or activity (Arlet et al., 2014; de Thonel et al., 2010; Ribeil et al., 2007) .

The question remains whether, through its association with complement C3, Gp96 contributes to the pathogenesis of this particular allo-immune disorder. The answer is not an easy one since Gp96 can affect different and apparent contradictory functions of complement C3 fragments. For instance, on the one hand, by inhibiting the C3b cleavage by the soluble regulator factor I, Gp96 can increase C3b levels. However, on the other hand, Gp96 can inhibit major functions of C3b such as opsonization and

formation of the convertase complexes. Interestingly, a similar incongruent impact on C3b has been reported for the Staphylococcal complement inhibitor (SCIN) family of proteins, which allow the bacteria to escape the complement attack. Remarkably, the SCIN proteins bind to the same region of complement C3 identified here for Gp96 interaction (Ricklin et al., 2009). This region that includes the α' NT, MG6 and MG7 domains (Suppl Fig 2), has been proposed as a functional C3 “hot spot”, important for binding several regulators (Ricklin et al., 2009) and notably factor H, which is a major regulator of the alternative pathway C3 convertase and the amplification loop of the complement pathway. Factor H also serves as a cofactor for C3b inactivation by factor I. For *S. aureus*, the final consequence, despite the paradoxical effect on C3b inactivation, is complement inhibition. Thus, in a similar manner, during GvHD, Gp96 could inhibit C3b and regulate complement C3 to avoid excessive damage and inflammation, the negative counterpart of this inhibition being a lower effect of complement on pathogens.

Mouse models of GvHD have shown that C3 is an important mediator of GvHD pathogenesis, suggesting again that Gp96 by regulating C3 may have a beneficial effect against GvHD development. C3 deficient recipient mice develop a less severe disease (Ma et al., 2012) and T cells deficient for C3a receptor have limited ability to induce GvHD (Kwan et al., 2012). In this work, we confirmed that C3 deficient recipient mice develop a less severe GvHD compared to wild type recipients. At the opposite, when C3 deficient mice are used as donors we found that the receiving mice developed a more severe GvHD and had increased levels of C3 -and Gp96- in their serum. We have no explanation at present for these results. Like C3^{-/-} mice, Daf^{-/-} mice used as donors also induce a more severe disease (Kwan et al., 2012). However, we did not find differences in Daf expression in our C3^{-/-} GvHD mice models (not shown). Independently of this unresolved issue, our results confirmed the link between C3 and Gp96 serum levels and the severity of the disease. Interestingly, our data using a peptide aptamer inhibitor of Gp96 indicates a strong aggravation of GvHD development (not shown). Unfortunately, there was also an increase in the animals' death in the syngeneic group. This strongly suggests that this toxicity obtained with the Gp96 inhibitor is not just the consequence of the inhibition of Gp96 effect on complement C3 but probably the result of all intra- and extra-cellular functions

described for this essential chaperone whose knockout is lethal for the animal (Wanderling et al., 2007).

In conclusion, irrespective of the undetermined matter of whether Gp96 by chaperoning complement C3 in the serum is beneficial for GvHD patients - a deep study will be needed to determine the role of the tandem Gp96/complement C3 in the pathogenesis of GvHD -, our results clearly show that Gp96 serum levels can be used as a marker of GvHD severity. A clinical study has started where the levels of Gp96 and complement C3 are being determined both in serum and in intestinal biopsies.

References

1. Ramadan A & Paczesny S Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Front Immunol.* 2015; 6: 14.
2. Wingard JR, Majhail NS, Brazauskas R et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 2230-2239.
3. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P & Holler E Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009; 373: 1550-1561.
4. Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood.* 2011; 118: 6702-6708.
5. Garrido C & Solary E A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ.* 2003; 10: 619-620.
6. Jarvis M, Marzolini M, Wang XN, Jackson G, Sviland L & Dickinson AM Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2003; 76: 849-853.
7. Stuehler C, Mielke S, Chatterjee M et al. Selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of heat shock protein 90: a novel strategy for control of graft-versus-host disease. *Blood.* 2009; 114: 2829-2836.
8. Tsan MF & Gao B Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol.* 2009; 85: 905-910.
9. Yang Y & Li Z Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells.* 2005; 20: 173-182.
10. Zhang Y, Wu BX, Metelli A et al. GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *J Clin Invest.* 2015; 125: 859-869.
11. Ochayon DE, Mizrahi M, Shahaf G, Baranovski BM & Lewis EC Human alpha1-Antitrypsin Binds to Heat-Shock Protein gp96 and Protects from Endogenous gp96-Mediated Injury In vivo. *Front Immunol.* 2013; 4: 320.
12. Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG & Adler AJ Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol.* 2004; 172: 6087-6092.
13. Suto R & Srivastava PK A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995; 269: 1585-1588.

14. Pawaria S & Binder RJ CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun.* 2011; 2: 521.
15. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N et al. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol.* 2000; 30: 2211-2215.
16. Ricklin D & Lambris JD Therapeutic control of complement activation at the level of the central component C3. *Immunobiology.* 2015.
17. Ma Q, Li D, Nurieva R et al. Reduced graft-versus-host disease in C3-deficient mice is associated with decreased donor Th1/Th17 differentiation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 1174-1181.
18. Huang QQ, Koessler RE, Birkett R et al. Glycoprotein 96 perpetuates the persistent inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 3638-3648.
19. Pagetta A, Folda A, Brunati AM & Finotti P Identification and purification from the plasma of Type 1 diabetic subjects of a proteolytically active Grp94 Evidence that Grp94 is entirely responsible for plasma proteolytic activity. *Diabetologia.* 2003; 46: 996-1006.
20. Schaiff WT, Hruska KA, Jr., McCourt DW, Green M & Schwartz BD HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J Exp Med.* 1992; 176: 657-666.
21. Staron M, Wu S, Hong F et al. Heat-shock protein gp96/grp94 is an essential chaperone for the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood.* 2011; 117: 7136-7144.
22. Ricklin D Manipulating the mediator: modulation of the alternative complement pathway C3 convertase in health, disease and therapy. *Immunobiology.* 2012; 217: 1057-1066.
23. Arlet JB, Ribeil JA, Guillem F et al. HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature.* 2014; 514: 242-246.
24. de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D et al. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood.* 2010; 116: 85-96.
25. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 2007; 445: 102-105.
26. Ricklin D, Tzekou A, Garcia BL et al. A molecular insight into complement evasion by the staphylococcal complement inhibitor protein family. *J Immunol.* 2009; 183: 2565-2574.
27. Kwan WH, Hashimoto D, Paz-Artal E et al. Antigen-presenting cell-derived complement modulates graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 2012; 122: 2234-2238.
28. Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O et al. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol Biol Cell.* 2007; 18: 3764-3775.
29. Przepiorka D, Chan KW, Champlin RE et al. Prevention of graft-versus-host disease with anti-CD5 ricin A chain immunotoxin after CD3-depleted HLA-nonidentical marrow transplantation in pediatric leukemia patients. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16: 737-741.
30. Pflieger D, Chabane S, Gaillard O et al. Comparative proteomic analysis of extracellular matrix proteins secreted by two types of skin fibroblasts. *Proteomics.* 2006; 6: 5868-5879.
31. Gordon DL, Rice J, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ & Hostetter MK Analysis of C3 deposition and degradation on bacterial surfaces after opsonization. *J Infect Dis.* 1988; 157: 697-704.

Figure legends

Figure 1 Gp96 expression in acute GvHD patients' sera. Available sera were sampled 7 days before onset (D-7), the day of acute GvHD onset (D0) as well as 7 days and 14 days after diagnosis (D+7 and D+14). Gp96 was quantified by ELISA. **A)** All acute GvHD patients included. **B)** aGvHD grade II vs

III-IV with gastro-intestinal GvHD. **C** Patients presenting isolated skin GvHD. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Figure 2 Gp96 expression in the murine GvHD model. **A** Mouse model of acute GvHD. Syn: syngeneic graft (no GvHD developed). BM: allogeneic graft without splenocytes (no GvHD). Allo: allogeneic graft with splenocytes (acute GvHD). **B** Survival of the mice belonging to the different groups. **C** Western blot analysis of Gp96 and Hsp90 in sera at day 7 after transplantation. Recombinant proteins were run as a control. **D** Western blot analysis of Gp96 expression in sera of mice developing GvHD (Allo) or not (Syn). **E** Proportion of splenic macrophages (according to F4/80 staining) expressing Gp96 at the surface was determined by FACS analysis, seven days after hematopoietic stem cells transplantation. ** $p < 0.01$ (n=4). A representative experiment out of three performed is shown.

Figure 3 C3 associates to Gp96 in mice's sera during GvHD. Western blot analysis of Gp96 (top panel) and Coomassie blue coloration of proteins co-immunoprecipitated with Gp96 (bottom panel) in mice developing GvHD (Allo) or not (Syn), seven days after hematopoietic stem cells transplantation. Ctl, mice with no transplantation. The proteins indicated were determined by mass spectrometry. One representative experiment is shown (n=2).

Figure 4 Mapping of Gp96 interaction with C3. **A** Linear structure of C3 (β -chain in yellow, α -chain in blue) and of the tested complement C3 fragments (see also Figure S2). **B** Yeast two-hybrid assay between the C3 fragments described in A and Gp96 full length. A representative picture is shown. **C** Linear structure of Gp96 and the analyzed deletion mutants. ABD: ATP-binding domain; Ca^{2+} : charged linker domain; PBD: peptide-binding domain. **D** Two-hybrid assay between complement C3 749-1303 amino acids fragment and Gp96 deletion mutants. A representative image is shown (n=3).

Figure 5 Gp96 effect on complement C3 activity. **A**) Gp96 inhibits C3b cleavage by factors I and H. Upper panel, western blot analysis of the α' -chain (C3b) and the α_2 -chain (iC3b and C3c), both

labelled with anti-C3c antibody and of the α 1-dg-chain (iC3b) labelled with anti-C3d antibody, after C3b incubation (0.3 μ M) with normal human serum, supplemented with factors I and H with or without purified human Gp96 (1.2 μ M). Lower panel: densitometry quantification. Cleavage without Gp96 is rationalized to 1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (n=5). **B**) Gp96 effect on opsonophagocytosis. Flow cytometry analysis of phagocytosis by human purified macrophages of Alexa Fluor 488-conjugated *Escherichia coli* bioparticles after opsonization by healthy human serum with or without Gp96 (1.5 μ M). A representative image of AF488 fluorescence in living cells is shown: the filled grey curve represents opsonization without serum, grey line with serum alone, black line with serum and Gp96, dotted black line with serum and “BSA in buffer”. Histograms of mean fluorescence intensity are shown. * $p < 0.05$ (n=3). **C**) Gp96 effect on opsonization. AF488-*Escherichia coli* bioparticles were incubated with serum with or without Gp96 (1.5 μ M). C3 and C4 were determined by western blots in supernatants after de-esterification of proteins tagged on bioparticles. One representative experiment is shown (n=3). **D**) Microscopy on AF488-bioparticles after C3 AF568-staining. Right panel: C3 bioparticles quantification (median of fluorescence of AF568-staining). * $p < 0.05$ (n=4). **E, F**) Gp96 effect on complement activation pathways. **E** Antibody-coated sheep erythrocytes (for classical pathway) and **F** rabbit erythrocytes hemolysis (for alternative pathway), in presence of Gp96 or controls. Hemolysis is represented by the absorbance of erythrocytes supernatants at 405 nm. * $p < 0.05$ (n=4).

Figure 6 Study of Gp96 in GvHD using complement C3 knockout animals. **A**) Left, schematic representation of the model of GvHD used with a $C3^{-/-}$ recipient: FvB/N \rightarrow wild type or $C3^{-/-}$ C57BL/6. Right, western blot analysis of C3 and Gp96 in day 7 sera of wild type or $C3^{-/-}$ mice, developing GvHD (Allo) or not (Syn and BM). **B**) Top, schematic representation of the mice model with a $C3^{-/-}$ donor: wild type or $C3^{-/-}$ C57BL/6 \rightarrow BALB/c. Left panel, western blot analysis of C3 and Gp96 in day 7 sera of mice receiving a wild type or a $C3^{-/-}$ graft, developing GvHD (Allo) or not (Syn and BM). Samples from 7 animals per group were pooled. Right panel, immunoprecipitation of Gp96 in the sera from the different described animals groups was followed by complement C3 immunoblotting. One representative experiment out of three performed is shown. **C**) Survival of the

mice belonging to the different groups described in B. D) Percentage of activated, splenic T cells ($CD3^+CD69^+$) seven days after hematopoietic stem cells transplantation in mice receiving either a wild type or a $C3^{-/-}$ graft, developing GvHD (Allo) or not (Syn and BM). * $p < 0.05$ (n=4) from two independent experiments.

Supplementary Figure legends

Figure S1 C3 associates to Gp96 in mice's sera during GvHD. Mass spectrometry analysis of fragments **A** 001, **B** 002, **C** 007 and **D** 010 from Figure 3, representing C3. C3 fragments are quoted according to the peptide found.

Figure S2 Schematic structures of complement C3 and C3 fragments. In yellow the β -chain; in blue the α -chain; in purple the thioester residues. α' NT: N-terminus of α' -chain; ANA: anaphylatoxin; CUB: complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1; LNK: linker region; MG: macroglobulin; TED: thioester-bond-containing domain.

Figure S3 Gp96 effect on opsonophagocytosis. Flow cytometry analysis of phagocytosis by human purified macrophages of Alexa Fluor 488-conjugated *Escherichia coli* bioparticles after 1 h-opsonization by serum in the absence or presence of Gp96, added either immediately (serum+Gp96) or after 30 min of incubation (serum+after 30min Gp96) of the bioparticles with the serum. Represented if the percentage of living cells showing fluorescence in AF488. * $p < 0.05$ (n=4).

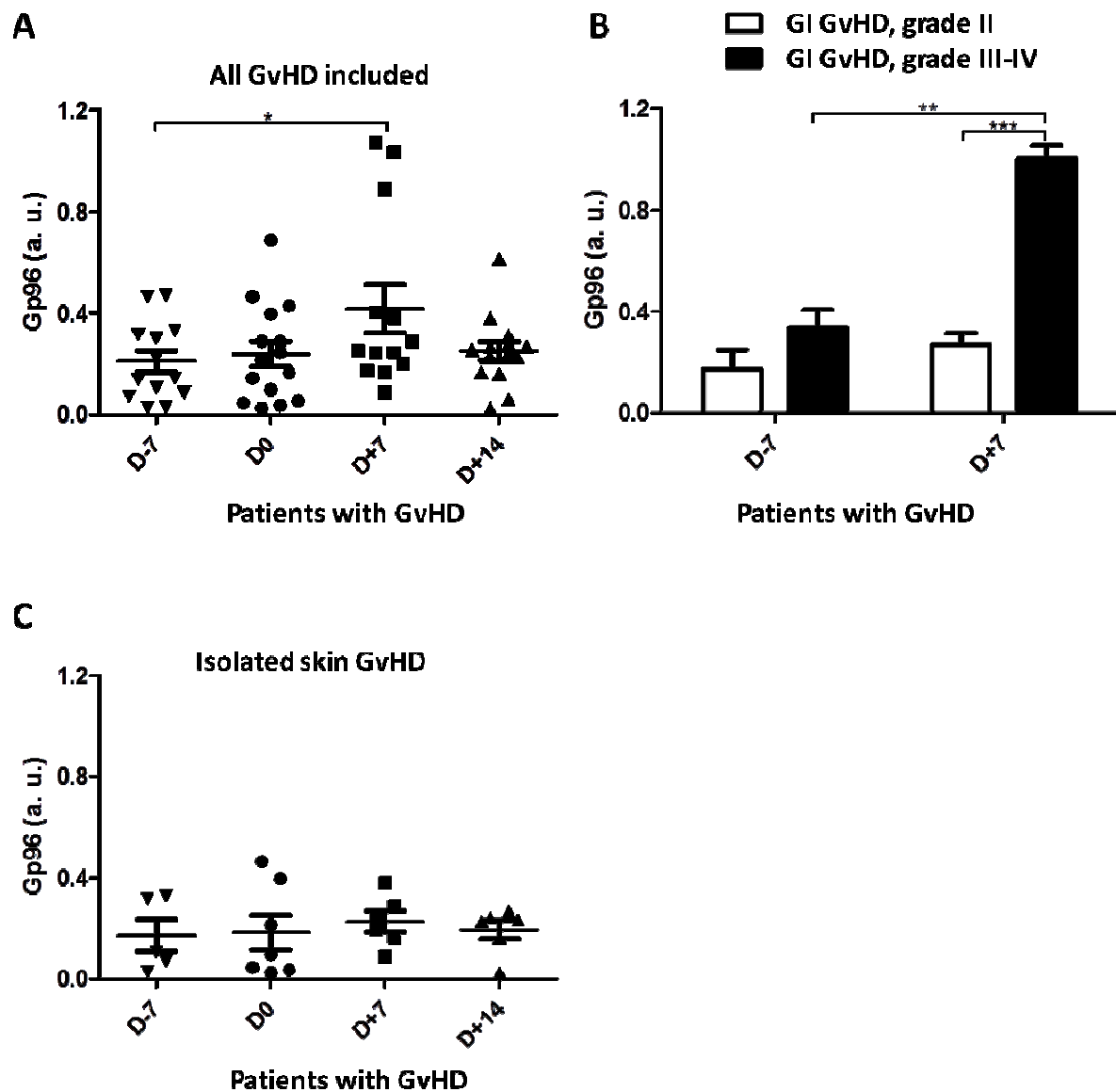


Fig 1

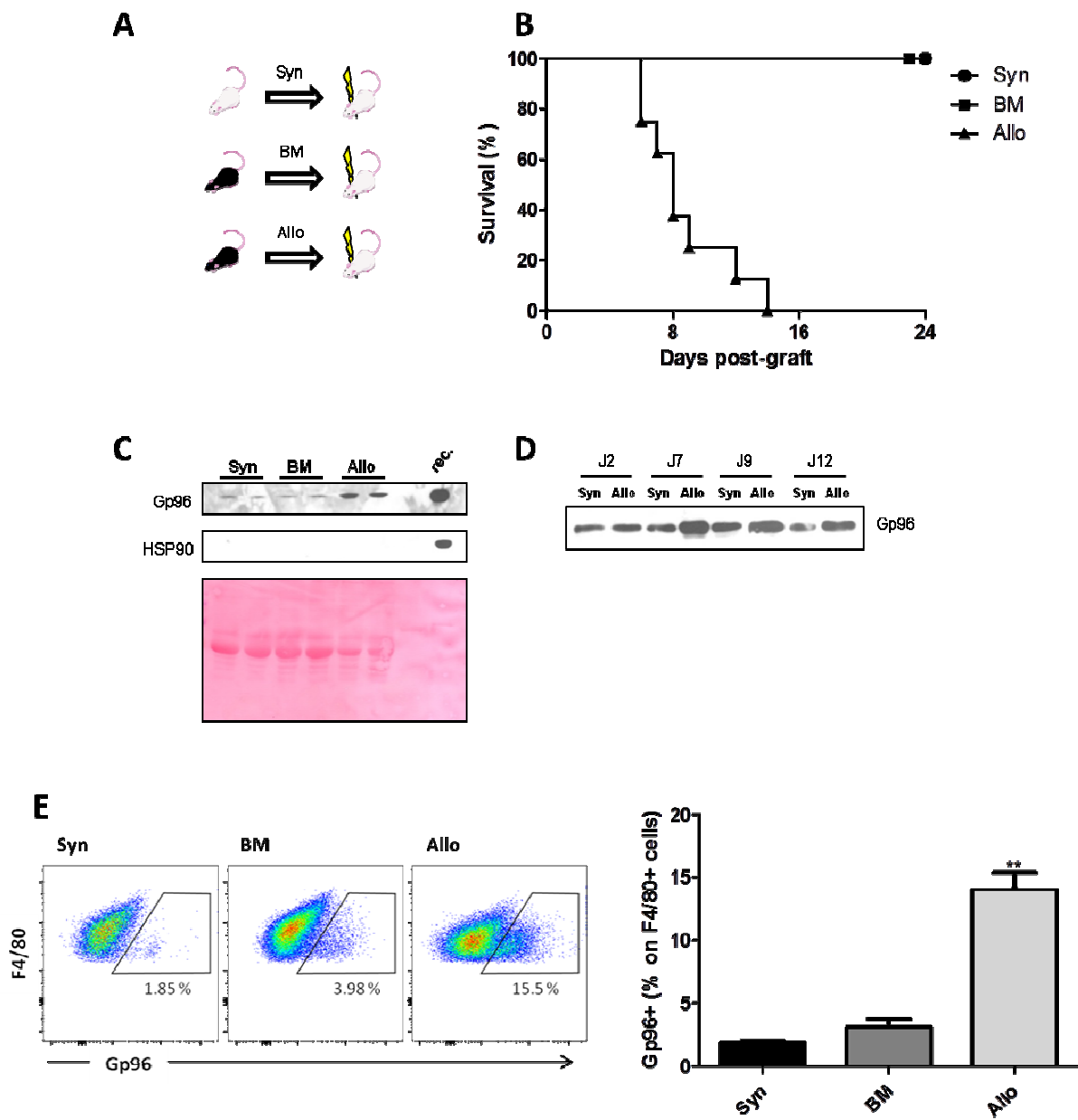


Fig 2

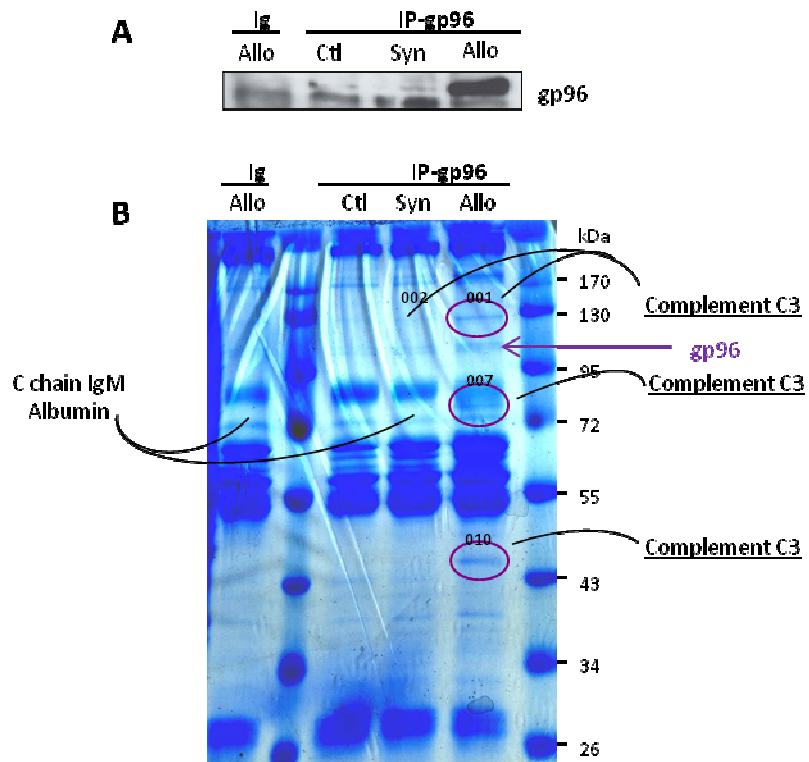
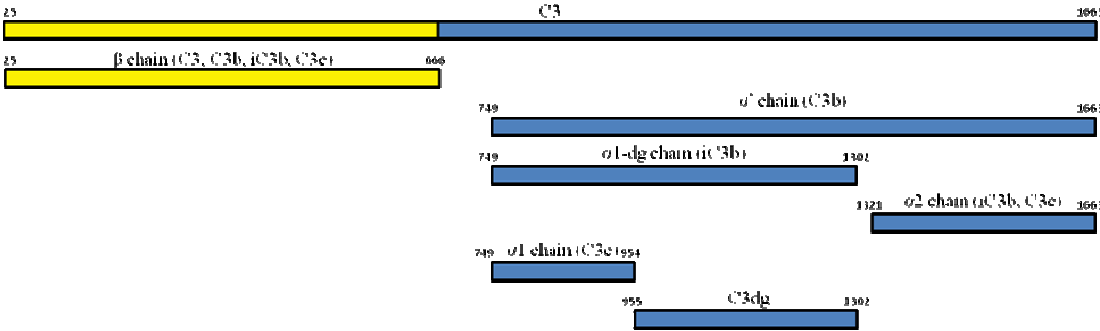
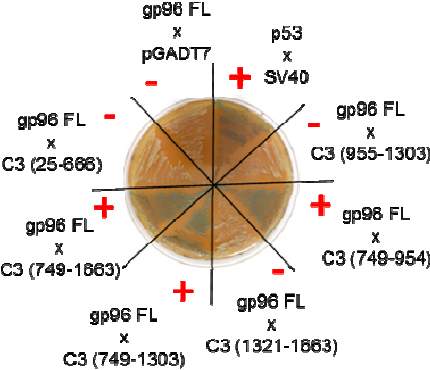


Fig 3

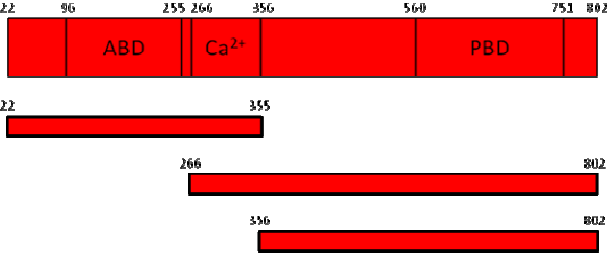
A



B



C



D

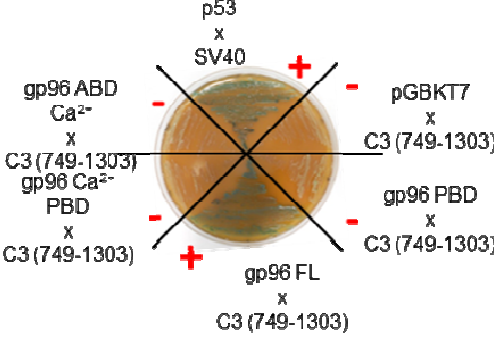


Fig 4

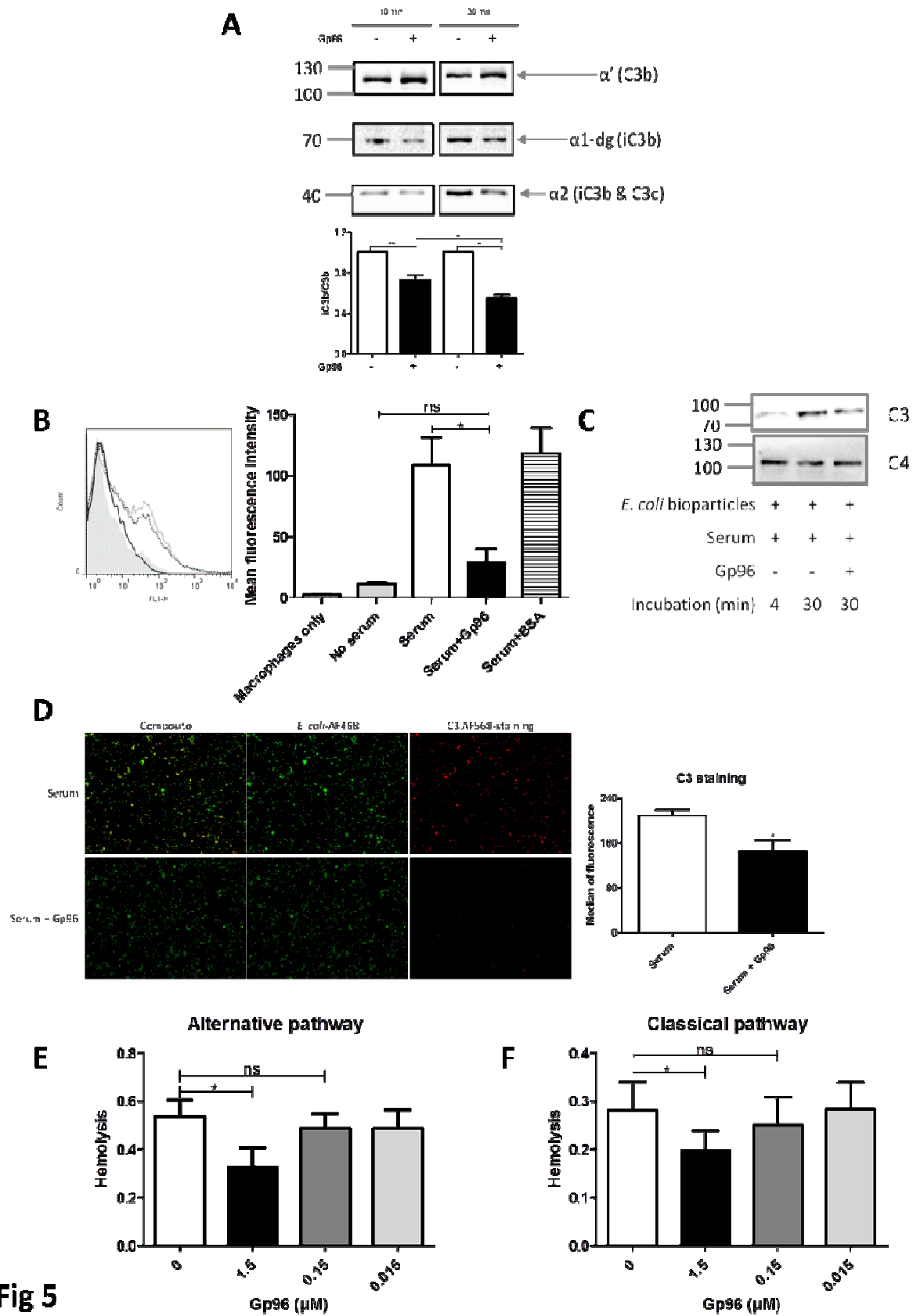
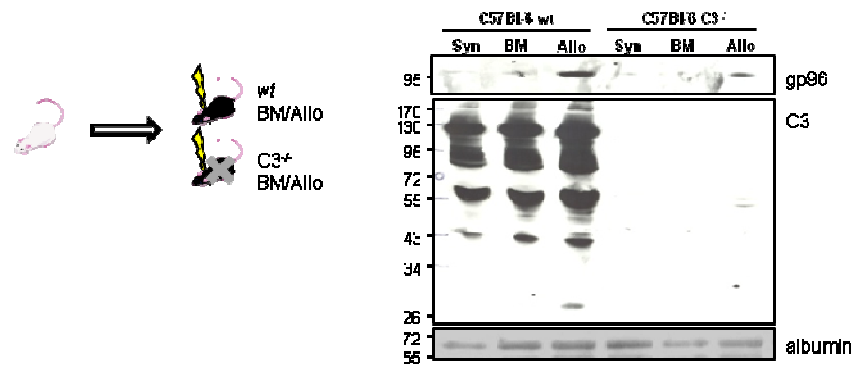
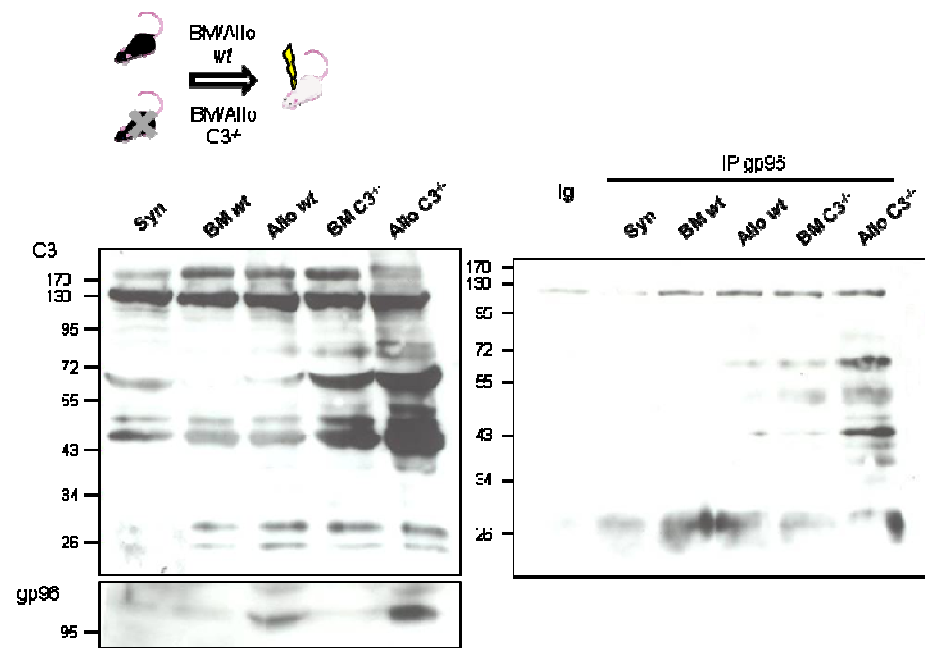


Fig 5

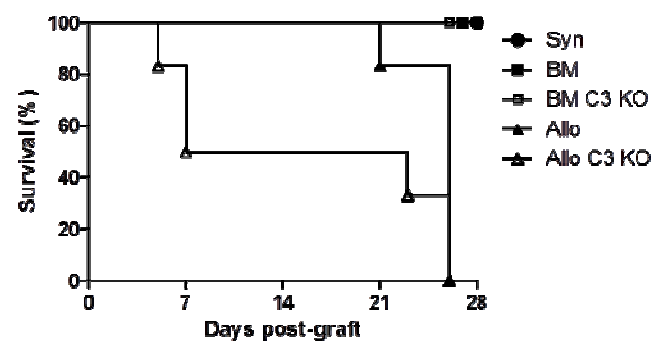
A



B



C



D

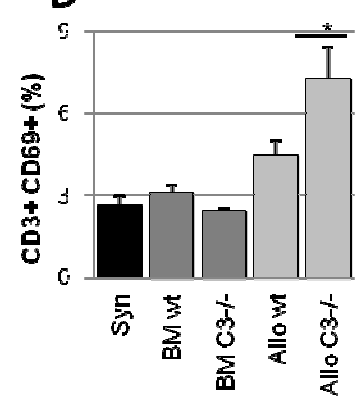


Fig 6

A

fragment 001 (≈ 130 kDa)	Position (aa)		25-666 75 kDa β (C3, C3b, iC3b, C3c)	667-748 10 kDa C3a	667-1663 120 kDa α (C3)		749-1379 66 kDa α1-dg (iC3b)	749-1663 110 kDa α' (C3b)	1384-1390 2 kDa C3f	1321-1663 42 kDa α2 (iC3b, C3c)
LREQHRR	734	740		X						
NRVFQTK	883	887				X				
LWENGILLR	1311	1320								X
SGSDEVQAGQQR	1571	1582								X
VMQDFIDLR	825	834				X				
GICVADPYEIR	814	824				X				
AFIDCCNHITK	723	733		X						
GRGT SVVAIVYHAK	1338	1351								X
AAVFNFHISDGVKK	914	927				X				
FYHPEKDDGMLSK	1492	1504								X
AVLFNYREQEELK	813	861				X				
KCCEDGMRCIPMR	692	704		X						
VHQYFNVLQPGSVK	1463	1478								X
SELEEDIIPEEDIIIR	749	764				X				
LEEPYLKFLNTAKDR	1202	1217					X			
SHFPQSWLWTEELK	765	779				X				
VDVPAADLSQVPTDSETR	963	979						X		
ILQGSFVYQMAEDAVUGER	983	999						X		
TDPGHEAKIRYYTYLVMNK	479	497	X							
QKPDGVFQEDGPVIHQEMIGGFR	1112	1134				X				
IRAFYEHAPK	207	216	X							
VYSYNNLEECSTR	1479	1491								X
TLKVYVEGMR	923	937				X				
IRYYTYLVMNK	487	497	X							
MFIKPGDNI NVNFHIRTDPCHFAPK	463	486	X							

B

fragment 002 (≈ 130 kDa)	Position (aa)		25-666 75 kDa β (C3, C3b, iC3b, C3c)	667-748 10 kDa C3a	667-1663 120 kDa α (C3)		749-1379 66 kDa α1-dg (iC3b)	749-1663 110 kDa α' (C3b)	1384-1390 2 kDa C3f	1321-1663 42 kDa α2 (iC3b, C3c)
LLWENGILLR	1311	1320	X							
IRAFYEHAPK	207	216	X							
GICVADPYEIR	814	824				X				
VMQDFIDLR	825	834				X				
IRYYTYLVMNK	487	497	X							
AAVFNFHISDGVKK	914	927				X				
AVLFNYREQEELK	813	861				X				
AFSNKNTLIVLEK										
VYSYNNLEECSTR	1479	1491								X
VHQYFNVLQPGSVK	1463	1478								X
SELEEDIIPEEDIIIR	749	764				X				
LEEPYLKFLNTAKDR	1202	1217					X			
VELLHNPAFCMATAKNR										
ILQGSFVYQMAEDAVUGER	983	999						X		
TDPGHEAKIRYYTYLVMNK	479	497	X							
GRGTLSVVAIVYHAK	1338	1351								X
IRYYTYLVMNK	487	497	X							
FYHPEKDDGMLSK	1492	1504								X
KCCEDGMRCIPMR	692	704		X						
VDVPAADLSQVPTDSETR	963	979						X		
QKPDGVFQEDGPVIHQEMIGGFR	1112	1134				X				
AGEYEAASYMNLQRPVTVATAGYALVMNK	1172	1201				X				

Fig S1

C

		25-666 75 kDa β (C3, C3b, iC3b, C3c)	667-1663 120 kDa α (C3)	667-748 10 kDa C3a	749-1663 110 kDa α' (C3b)	749-1303 66 kDa α1-dg (iC3b)	1304-1320 2 kDa C3f	1321-1663 42 kDa α2 (iC3b, C3c)
fragment 007 (≈ 75 kDa)	Position (aa)							
NRYPQTK	880 887			X				
DFDSVPFAIR	1215 1251				X			
VMODITIDLR	825 894			X				
GICVADPYER	814 824			X				
IKYIYLVNKK	487 497	X						
DSCIITLVKGDPR	557 570	X						
NYAGVNDAGLAFK	633 646	X						
AAVFNHFISDGLAK	914 927			X				
AFDCNNHITQLR	723 735							
SELEEDIPEDDIR	749 764			X				
AVLFNIREQELKVR	849 863			X				
SHFPOSILYITEELK	765 779			X				
TVVHTLDPEKLGQGGVCK	941 950			X				
IIIQSPVYQMAFDVVGFP	980 999				X			
TDPGHEAKRYTYLVNKK	479 497	X						
QKPDGVQCDGPPVIGCMGGFR	1112 1134					X		
YLGDVDAIINSLDISMVTGFAPDTK	1322 1416							X
VMNIFLKDSTTWEILAVSLQHK	790 813			X				
DICE3GVNLEFGSINK	1150 1171				X			

D

		25-666 75 kDa β (C3, C3b, iC3b, C3c)	667-1663 120 kDa α (C3)	667-748 10 kDa C3a	749-1663 110 kDa α' (C3b)	749-1303 66 kDa α1-dg (iC3b)	1304-1320 2 kDa C3f	1321-1663 42 kDa α2 (iC3b, C3c)
fragment 010 (≈ 16 kDa)	Position (aa)							
SGSDVDAQGQQR	1571 1582							X
GRGTLVVAVYHAK	1338 1351							X
ISHTIEDCLTFK	1451 1462							X
FYHPEKDDGMLSK	1422 1504							X
VYSYVNIFFSCTR	1479 1491							X
VHOYFNVGLIQGSAK	1453 1478							X
TDPGIEAKRYYTYLVNKK	479 497	X						
LCISEMCR	1535 1512							X
DLELLASGVN	1417 1427							X
GTLSVYAVYHAK	1340 1351							X
ACFPQVDYVVK	1536 1546							X
LVAVYTUGASGQR	531 544	X						
AVLFNIREQELK	849 861				X			
KCCEDGMRDIPMR	692 704			X				
CAEENCFMJGSGEK	1513 1526							X
YSIRPAPETAKKPEEAK	1355 1381							X
NTJITLEK	1442 1450							X
TLKAVPEGMR	928 927				X			
MTVFLEKTK	1392 1391							X
KDTLPESRQATK	426 439	X						
DNHLAPGGQTTLR	571 583	X						
LDKACEPGVDYVVK	1533 1546							X
DTWVEHMPAECECDQK	1625 1641							X

Fig S1 (continued)

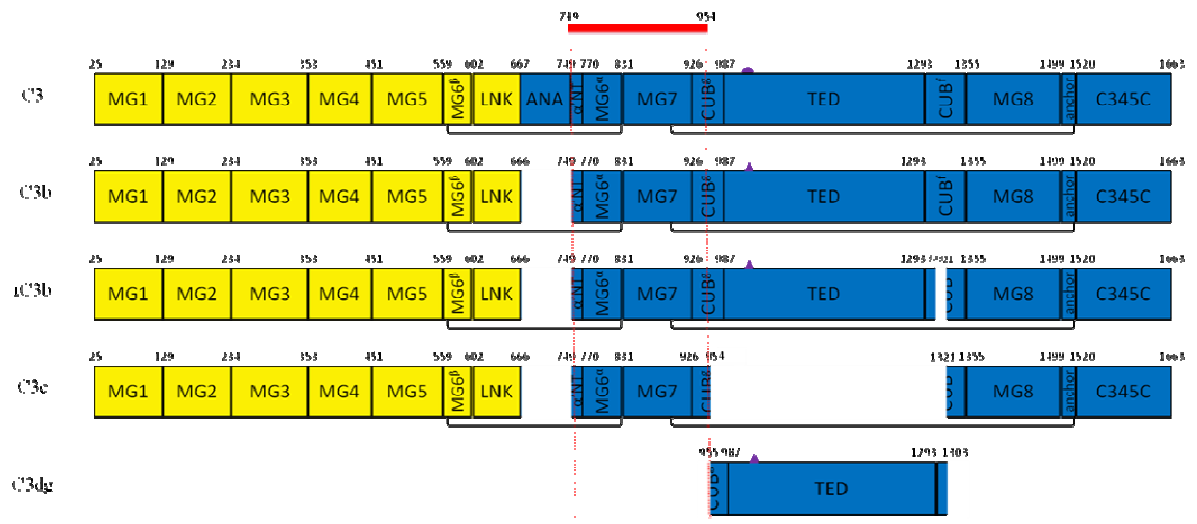


Fig S2

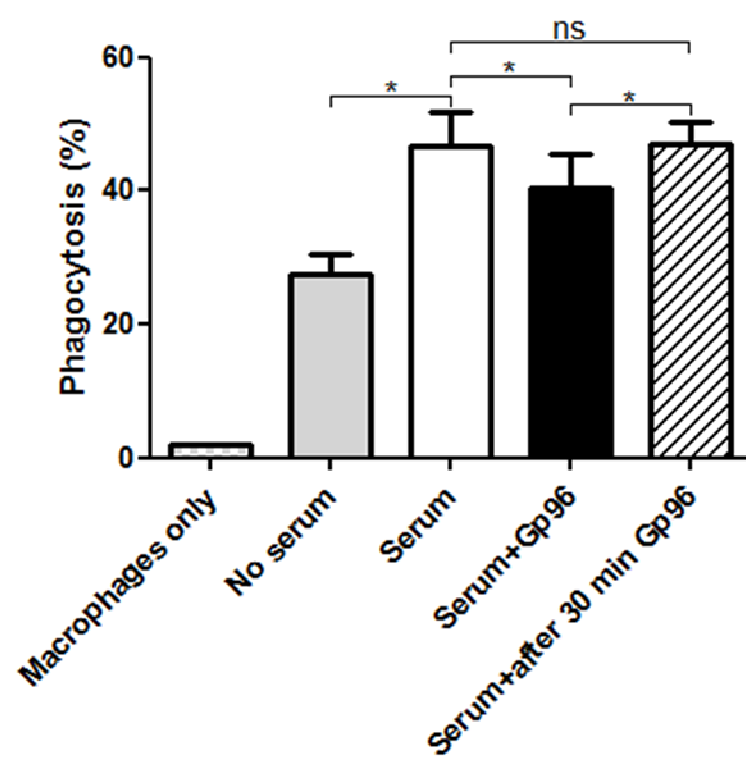


Fig S3

Conclusion

La concentration sérique de Gp96 augmente chez des patients développant la GvH environ une semaine après le diagnostic de la maladie. L'augmentation est surtout nette lorsque la GvH est sévère (grade global III ou IV) ; elle n'a pas lieu pour les patients développant seulement une GvH cutanée. La cinétique d'expression sérique de Gp96 suggère qu'elle est libérée par les dommages tissulaires dus à la GvH.

On connaît de nombreux rôles à Gp96, notamment dans l'immunité. Dans le RE, Gp96 participe à la bonne conformation de certaines protéines ; dans le secteur extracellulaire, Gp96 est aussi capable d'interagir avec des protéines, mais les conséquences n'en sont pas élucidées. Notre travail montre que Gp96 interagit avec C3 dans le sérum. La région de C3 impliquée dans l'association fait partie de la chaîne $\alpha 1$ (acides aminés 749 à 954), une chaîne comprise dans C3 et ses fragments C3b, iC3b et C3c. Le complément est un système finement régulé, en première ligne dans la réponse immunitaire innée ; C3 y joue un rôle prépondérant, et est aussi capable de potentialiser les réponses immunitaires adaptatives.

Nous montrons que Gp96 inhibe le clivage de C3b par les facteurs I et H, réduit l'opsonophagocytose et inhibe les voies d'activation classique et alterne du complément. Bien qu'il semble donc que Gp96 exerce plutôt un effet régulateur sur le complément, il est toutefois difficile de conclure certainement sur la signification de l'association de Gp96 et C3 dans la GvH.

En outre, nous montrons que, dans un modèle de GvH aiguë, des souris qui reçoivent un greffon d'une souris C3^{-/-} développent une GvH plus sévère et ont des concentrations sériques de C3 et de Gp96 fortement élevées. Cela pourrait s'expliquer par un défaut de régulateur sur les cellules du donneur. Nous avons toutefois trouvé le régulateur DAF chez les souris C3^{-/-} (données non montrées). Ces expériences confirment l'association de C3 et Gp96 et leur corrélation avec la GvH.

Une étude de plus grande ampleur pourrait analyser la pertinence d'utiliser Gp96 comme biomarqueur de sévérité et d'atteinte intestinale dans la GvH. L'éclaircissement des conséquences de l'association entre Gp96 et C3 nécessite d'autres travaux ; à cette fin, une inhibition de Gp96 dans le modèle de GvH aiguë pourrait être utile.

DISCUSSION

Nos travaux de thèse montrent qu'HSP90 et Gp96 sont impliquées dans la GvH. Le premier article met en évidence qu'un traitement par la 17AAG, un inhibiteur spécifique des HSP90, atténue la GvH dans un modèle murin. Les HSP90 interviennent dans la réponse des cellules au stress. L'environnement inflammatoire engendre et entretient la GvH de façon majeure. Or, une réponse à ces stress inadaptée qui conduirait à l'apoptose avec libération de DAMP (Garg et al., 2013) pourrait favoriser la maladie. Nous montrons qu'en utilisant la 17AAG à faible dose, l'UPR est favorisée dans les cellules épithéliales intestinales comme en témoigne l'augmentation de l'épissage d'XBP-1, donc que les stress qu'affrontent ces cellules, dus au conditionnement et à la GvH, sont mieux résolus, permettant leur survie. Cela résulte en une GvH atténuée. Les cellules de Paneth notamment sont protégées ; nos observations renforcent l'idée déjà bien établie qu'elles jouent un rôle prépondérant dans la gravité de la GvH (Levine et al., 2013). Bien que la 17AAG inhibe l'activation des lymphocytes T, c'est en effet la préservation de la barrière intestinale qui semble majeure dans son effet protecteur. D'ailleurs, ce traitement ne diminue pas l'effet GvL dans notre étude. Cependant, l'on peut supposer que la 17AAG résolve le stress du RE dans d'autres cellules importantes, voire qu'elle exerce d'autres effets contribuant à la prévention de la GvH.

Nous n'avons pas retrouvé HSP90 dans les sérums de souris du modèle de GvH aiguë prélevés à J7. Pourtant, les HSP90 pourraient aussi jouer un rôle au niveau extracellulaire, libérées par la lyse cellulaire : des immunoglobulines M dirigées contre HSP90 (et des immunoglobulines M dirigées contre HSP70, mais pas d'anticorps anti-HSP60) ont été retrouvées dans la GvH aiguë et chronique, ce qui a conduit les auteurs à suggérer de cibler HSP90 et HSP70 dans la thérapie contre la GvH, bien qu'au cours de cette étude ces HSP n'aient pas non plus été retrouvées elles-mêmes dans les sérums (Goral et al., 2002). Les HSP90 cytosoliques ont été identifiées dans le secteur extracellulaire dans des cancers métastatiques (Eustace et al., 2004), et leur inhibition réduirait le phénomène de métastase (Seo, 2015). Il n'est pas à exclure que, à un certain moment dans la physiopathologie de la GvH,

HSP90 extracellulaire pourrait participer à un phénomène délétère dans la GvH, dont l'inhibition par la 17AAG concourrait à son effet protecteur. Il pourrait être intéressant d'étudier cette hypothèse.

Sachant que l'affinité de la 17AAG pour HSP90 et Gp96 est semblable (et très supérieure à celle pour TRAP-1) (Bhat et al., 2014), selon Ge et ses collaborateurs, une partie des réponses *in vivo* à la 17AAG pourrait être imputée à l'inhibition de Gp96 (Ge et al., 2006). Dans le RE, Gp96, en tant que chaperon moléculaire, contribue à la bonne conformation de certaines protéines membranaires, comme les TLR, les intégrines (Randow and Seed, 2001) et les molécules du CMH de classe II (Schaiff et al., 1992). Ces trois protéines jouent un rôle primordial dans la physiopathologie de la GvH (Koyama et al., 2012; Sivula et al., 2012; Waldman et al., 2006). L'inhibition de Gp96 du RE pourrait donc se traduire par une atténuation de la GvH, par diminution de l'expression de certaines de ses protéines clientes. Nous montrons que le traitement par 17AAG abaisse la concentration intracellulaire de Gp96 (Figures 1C, D et 3A, B de l'article 1). Il est difficile de conclure quant à l'impact physiopathologique de cette inhibition partielle. Une étude, dans le même modèle, de l'expression des protéines citées, notamment au niveau intestinal, apporterait d'intéressants éléments de réponse.

La 17AAG est dégradée *in vivo* en 17AG, très voisine, mais aussi pour partie en acroléine, un composé hautement toxique (Egorin et al., 1998). Il se pourrait qu'elle induise trop d'effets néfastes en médecine humaine pour être envisagée comme médicament. De graves effets indésirables ont été relevés chez des patients en essais cliniques (Biamonte et al., 2010). Toutefois, notre travail suggère que la 17AAG exerce un effet protecteur contre la GvH à une dose plus faible que celle qui est utilisée ordinairement pour ses propriétés anticancéreuses (10 mg/kg *versus* 80 mg/kg en général). À la posologie optimale pour la prévention de la GvH, la 17AAG pourrait être tolérée. Dans le cas contraire, une piste serait de tester des inhibiteurs de HSP90 proches de 17AAG mais moins toxiques (Bhat et al., 2014; Seo, 2015).

Nous constatons que la concentration sérique de Gp96 augmente une semaine après diagnostic de la GvH chez l'homme ; les GvH intestinales de grade global III ou IV semblent être très largement responsables de cette hausse. Dans le sérum de souris receveuses développant une GvH aiguë donnant notamment lieu à une atteinte intestinale, elle est sécrétée d'abord à cause de l'irradiation, puis

surexprimée à l'apparition de la GvH, et enfin diminue petit à petit. Chez nos patients, la GvH a été diagnostiquée entre le sixième jour et le quarante-septième jour après alloCH (moyenne : au vingt-deuxième jour toutes GvH incluses, au vingt-quatrième jour pour les GvH intestinales de grade III-IV). Le décalage d'une semaine chez l'homme entre le diagnostic de la GvH et l'augmentation de Gp96 sérique laisse à penser que la sécrétion de Gp96 est une conséquence de la GvH, c'est-à-dire qu'elle serait libérée au cours de l'endommagement des tissus. Notre modèle murin est propice à l'étude clinique parce qu'il induit une GvH rapidement (autour de J7) et à coup sûr (Schroeder and DiPersio, 2011). Il est possible que, dans ce modèle, la pathologie soit si fulgurante et la destruction des tissus si aiguë et massive que Gp96 serait libérée en grande quantité sur le moment. La diminution de Gp96 observée chez les patients quatorze jours après le diagnostic de GvH, donc sept jours après l'augmentation sérique de Gp96, pourrait être l'effet du traitement curatif mis en place, qui limite les dégâts tissulaires. Toutefois, la diminution a aussi lieu chez les souris quelques jours après augmentation alors qu'elles ne reçoivent pas de traitement. Il est donc difficile de conclure sur ce point.

Notre résultat chez les patients nous conduit à estimer qu'une étude de plus grande ampleur sur Gp96 en tant que biomarqueur de sévérité et de l'atteinte intestinale pour la GvH serait pertinente. À ce jour aucun biomarqueur n'est standardisé dans la GvH, bien que plusieurs molécules fassent office de candidats sérieux (Lv et al., 2013; Paczesny et al., 2009b). En particulier, REG-3 α augmente chez les patients développant une GvH intestinale, encore davantage à grade élevé, et signe un mauvais pronostic (Ferrara et al., 2011). Cette étude de Ferrara et ses collaborateurs débutait par une analyse protéomique menée sur des sérums prélevés le jour même de l'apparition des premiers symptômes de la GvH ; c'est peut-être pourquoi nulle augmentation de Gp96 n'est apparue. Par ailleurs, dans sa vaste étude sur les biomarqueurs plasmatiques potentiels de la GvH, Paczesny et ses collaborateurs n'ont pas compris Gp96 dans les deux cents protéines recherchées (Paczcsny et al., 2009b). Dans la mesure où un panel de biomarqueurs est souhaitable puisque la GvH est une pathologie aux manifestations similaires à plusieurs autres (Paczcsny, 2013), Gp96, dosée le jour du diagnostic et une semaine après, pourrait préciser l'atteinte intestinale, la sévérité, et peut-être le pronostic.

Par ailleurs, Gp96 a été retrouvée surexprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales dans la maladie de Crohn, où, en interagissant avec *Escherichia coli* adhérent et invasif, elle favorise son invasion (Rolhion et al., 2010). Nous avons cherché par immunohistochimie chez la souris si Gp96 est aussi surexprimée au niveau intestinal dans la GvH (Figure 11, non publiée). Par rapport au groupe témoin (BM), elle est en effet surexprimée au même site que rapporté dans la maladie de Crohn. Le secteur intestinal est une réserve importante de signaux de danger dans la GvH, et les GvH intestinales en général sont les plus sévères et ont le pire pronostic (Hill and Ferrara, 2000). Une bactériémie précoce augmente le risque de survenue de GvH aiguë (Poutsika et al., 2011). Gp96 lie la toxine A de *Clostridium difficile* (Na et al., 2008), infection fréquente dans la GvH intestinale (Alonso et al., 2012; Chakrabarti et al., 2000), et augmente ses dommages. Gp96 lie aussi le LPS (Reed et al., 2003) ; nous avons montré que cette liaison se traduit par une activation plus forte des cellules dendritiques et des lymphocytes T dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte, c'est-à-dire d'alloréaction entre ces deux populations de cellules (Figure 12, non publiée). En somme, comme pour la maladie de Crohn, Gp96 pourrait contribuer à l'aggravation de la GvH en favorisant la virulence de bactéries intestinales.

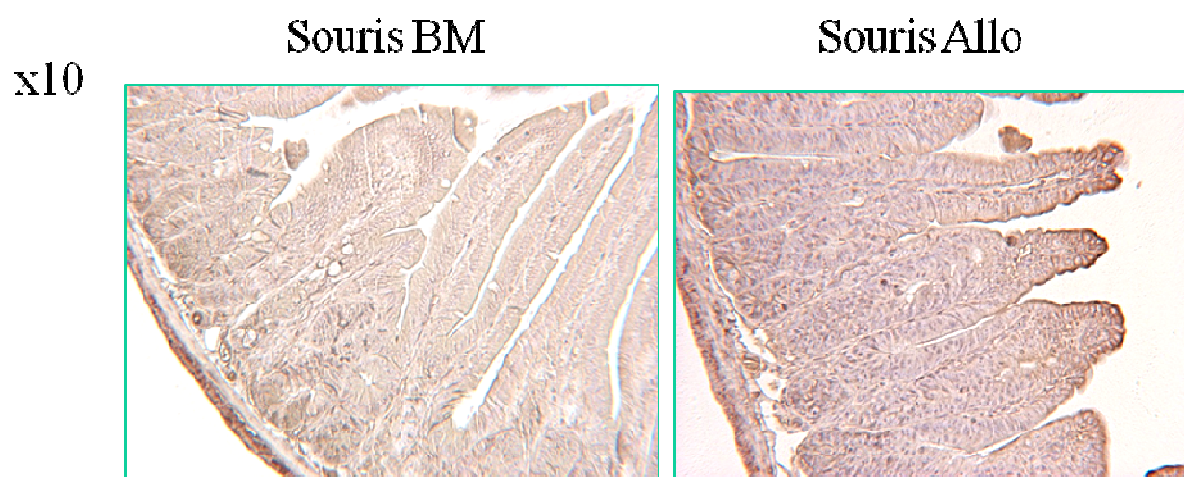


Figure 11 : Marquage immunohistochimique de Gp96 au niveau duodéal.

Marquage immunohistochimique (en rouge sombre) de Gp96 au niveau des villosités intestinales du duodénum, sept jours après alloCH dans le modèle murin de GvH aiguë. Les souris Allo développent

une GvH contrairement aux souris BM. Grossissement total : 100 x. L'expérience a été réalisée trois fois.

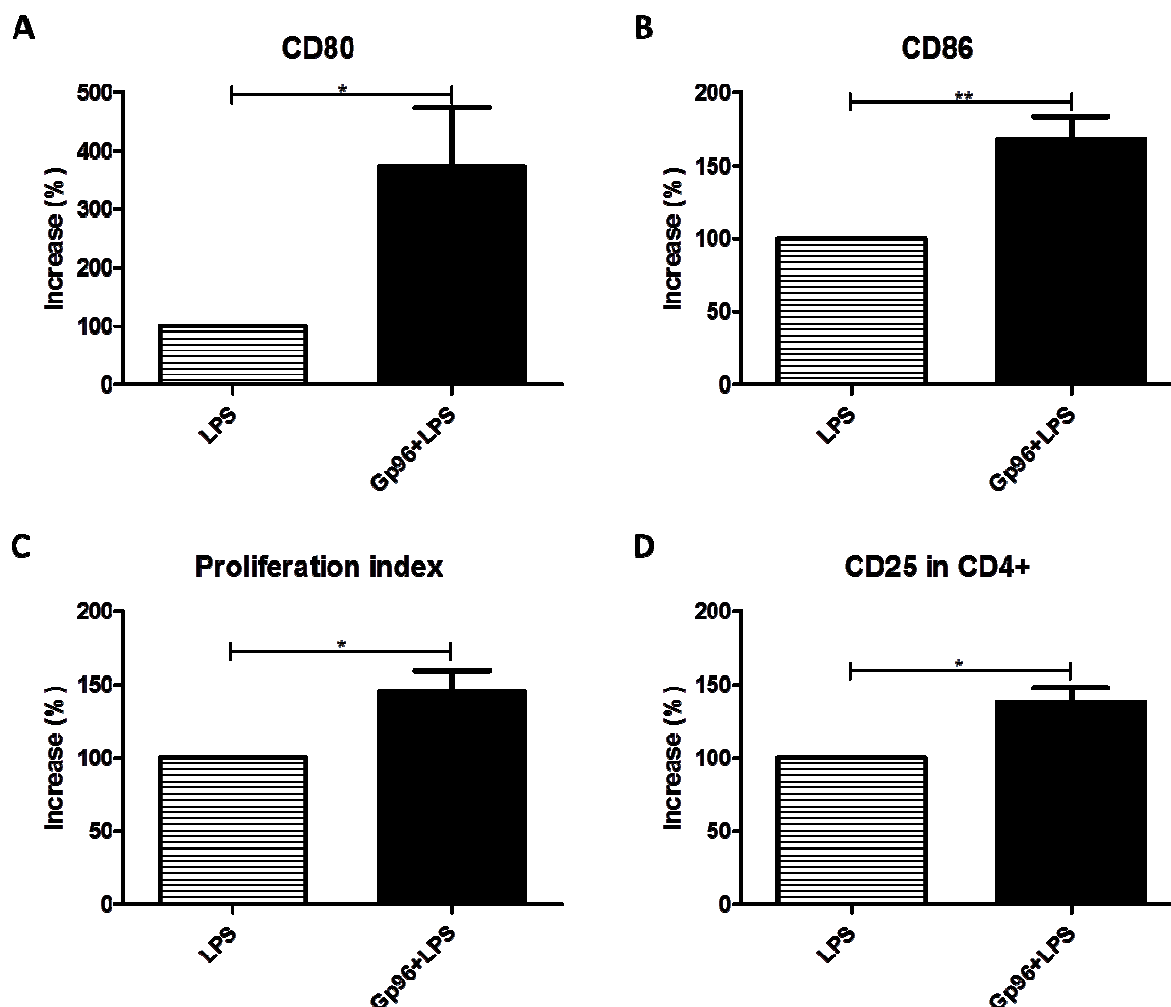


Figure 12 : Activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T dans un modèle de réaction lymphocytaire mixte.

Les cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur ont été cultivées en cellules dendritiques avec du GM-CSF et de l'IL-4 pendant 5 j, à l'issue desquels elles ont été stimulées pendant 24 h par du milieu, du LPS à 13 ng/ml, ou une préparation de Gp96 humaine recombinante (MyBioSource, États-Unis) produite dans *Escherichia coli* et dont la contamination en LPS a été dosée à 13 ng/ml par chromatographie couplée à une spectrométrie de masse (LipSTIC®). Puis les lymphocytes T d'un autre donneur ont été triés négativement à partir de ses cellules mononucléées de sang périphérique, marqués par une sonde fluorescente CellTrace (Molecular Probes, France) et ajoutés aux cellules

dendritiques pendant 5 j. Pour les cellules dendritiques, l'expression de **A** CD80 et **B** CD86, deux signaux de costimulation, a été mesurée par marquage immunofluorescent ($n = 6$) ; pour les lymphocytes T, **C** la prolifération a été suivie grâce à la sonde fluorescente, et l'expression de CD4 (non montrée) et **D** CD25 mesurée par marquage immunofluorescent ($n = 5$). L'acquisition a été réalisée par le LSR II (BD Biosciences, France). L'indice de prolifération a été calculé par le logiciel Modfit® à partir de la fluorescence de la sonde. La stimulation par le LPS seul est significativement supérieure à celle du milieu (non montré). Test t. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Gp96 : glycoprotéine 96 ; LPS : lipopolysaccharide.

Connaissant le rôle de chaperon moléculaire de Gp96, nous avons voulu analyser dans notre modèle murin quelles protéines étaient liées à Gp96 sérique à l'apparition de la GvH. Après immunoprécipitation de la protéine chaperon, de nombreuses bandes sont apparues à la coloration protéique. L'analyse de celles qui étaient nettement plus intenses chez les souris du groupe développant la GvH a montré qu'il s'agissait du C3 du complément. Toutefois, C3 a aussi été trouvé, bien que plus discrètement, dans la souris recevant une greffe syngénique (prélèvement 002). Chez la souris contrôle (non greffée), une bande très mince apparaît à la même hauteur, mais elle n'a pas été analysée. Cette observation suggère que l'association de Gp96 et C3 ne serait pas spécifique de la GvH.

Nos travaux ne permettent pas de conclure catégoriquement quant aux conséquences de cette association. Nous montrons qu'en liant C3b, Gp96 inhibe la formation de la convertase de C5 de la voie classique, donc la libération de l'anaphylatoxine C5a et la formation du complexe d'attaque membranaire ; et, en inhibant la voie alterne, elle inhibe la génération des mêmes composés, de C3a et de C3b. L'inhibition de l'opsonophagocytose, due à un défaut de dépôt de C3b à la surface des particules bactériennes, peut provenir de l'entrave de ce dépôt par Gp96 liée à C3b, ou du défaut de production de C3b par inhibition de la voie alterne par Gp96. Enfin, Gp96 inhibe le clivage de C3b par les facteurs I et H.

Cette inhibition du clivage de C3b, apparemment paradoxal avec l'inhibition de sa production, pourrait être un effet collatéral. Gp96 inhibe le clivage de C3b par les facteurs I et H en présence d'une

petite quantité de sérum normal chauffé (1/170), additionnée au milieu expérimental pour permettre le fonctionnement de Gp96. Le sérum humain contient des protéases capables de cliver les composants du complément, autres que le facteur I (Oikonomopoulou et al., 2013). Le clivage de C3b observé est donc le résultat de l'activité, d'une part, des facteurs I et H, et d'autre part, des protéases présentes dans le sérum. En présence d'une quantité un peu supérieure de sérum (1/60) et sans addition des facteurs I et H, Gp96 n'inhibe pas le clivage de C3b (Figure 13A, données non publiées). Elle n'inhibe pas non plus le clivage d'iC3b par du sérum (1/60) (Figure 13B, données non publiées). Ces résultats suggèrent fortement que Gp96 inhibe spécifiquement le clivage de C3b par les facteurs I et H. Le facteur H est le cofacteur du facteur I pour ce clivage ; il se lie sur plusieurs régions de C3b, notamment une région comprise dans la chaîne $\alpha 1$ (Wu et al., 2009). C'est une région de C3 particulièrement impliquée dans des interactions avec d'autres protéines du complément (Tableau IV). Il est fascinant de remarquer que cette région est aussi ciblée par des protéines bactériennes en vue d'échapper à l'action du complément, comme les protéines SCIN (*staphylococcal complement inhibitor*) (Rooijakkers et al., 2007), faisant dire à Ricklin qu'il s'agit d'un point névralgique (« *hot spot* ») pour l'élaboration de thérapeutiques visant C3 (Ricklin, 2012). Nous montrons que Gp96 cible aussi cette région (Figure 4 et Figure supplémentaire 2 de l'article 2). Il est clairement envisagé que ces protéines entrent en compétition pour la liaison à C3b (Janssen et al., 2006). Parmi les protéines du complément autres que le facteur H, il y a le facteur B (Janssen et al., 2006). La liaison du facteur B à C3b est le point de départ de la boucle d'amplification de la voie alterne. L'inhibition de la voie alterne par Gp96 pourrait découler de l'inhibition compétitive de la liaison du facteur B à C3b ; nous sommes en train de vérifier cette hypothèse par mesure immunoenzymatique de la liaison du facteur B à C3b en présence ou non de Gp96. L'inhibition du clivage de C3b par entrave de la fixation du facteur H serait donc un effet collatéral de celle du facteur B, parce que facteur B, facteur H et Gp96 interagissent avec des sites compris dans la même région de C3b. Cette hypothèse validée, il serait intéressant de mesurer par résonance plasmonique de surface l'affinité de ces trois protéines pour C3b, pour déterminer laquelle s'y lie plus facilement. En outre, une cristallographie entre Gp96 et C3b aiderait beaucoup à mieux comprendre les tenants et les aboutissants de leur interaction. Nous sommes

actuellement en train de modéliser de façon tridimensionnelle l'interaction de Gp96 avec le fragment 749-954 de C3b, en collaboration avec l'équipe du Pr Patrick Senet (Institut Carnot de Bourgogne).

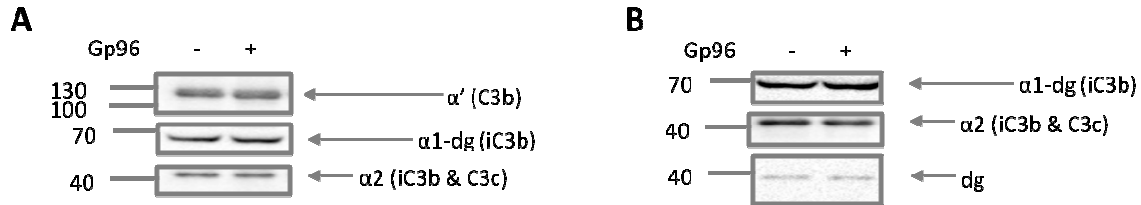


Figure 13 : Clivage de C3b et iC3b par du sérum normal humain seul.

Clivage de **A** C3b et **B** iC3b (0,3 μ M) par du sérum humain normal (1/60) en présence ou non de Gp96 (1,2 μ M), après 10 min d'incubation à 37 °C (sans addition de facteurs I ni H). Ces immunoempreintes sont représentatives de trois expériences différentes.

L'activation du complément est indispensable à des réponses immunitaires efficaces (Peng et al., 2008; Strainic et al., 2008; Zhou et al., 2006). Le ralentissement de la voie alterne du complément (Heeger et al., 2005) et la diminution de l'opsonophagocytose (Baudino et al., 2014) diminuent les réponses T, tandis que la diminution de C3a induit la production de Treg naturels (Kwan et al., 2013). Dans la GvH, le complément oriente la réponse T vers un phénotype Th1 et Th17 (Ma et al., 2014). Gp96 pourrait donc réguler le pouvoir inflammatoire et potentialisateur de C3 dans la GvH. D'un point de vue conceptuel, il s'agirait de l'association originale de deux signaux de danger afin d'éviter une réponse immunitaire innée et adaptative excessive. En l'occurrence, ce contrôle ne suffirait pas à empêcher la GvH. Toutefois, il n'est pas inenvisageable qu'il participe à une limitation des dommages tissulaires, que traduirait le déclin de Gp96 observée dans les sérums de souris après installation de la GvH aiguë.

Quant à Gp96, la protéine entière paraît requise pour interagir avec C3. Son domaine N-terminal comporte le site de liaison à l'ATP, indispensable à son activité chaperon (Ostrovsky et al., 2009). Il paraît donc logique que Gp96 amputée de ce domaine ne puisse plus lier C3. Son domaine C-terminal sert à l'homodimérisation et pourrait comporter des sites de liaison aux protéines. Gp96 a été retrouvée dans le plasma sous forme d'hétérodimères (Pagetta et al., 2003). Trois hypothèses peuvent

donc être formulées : Gp96 doit d'abord être un homodimère pour s'associer avec C3 ; la conformation tridimensionnelle de Gp96 sans extrémité C-terminale lui fait perdre sa capacité à interagir avec C3 ; C3 interagit avec l'extrémité C-terminale de Gp96. Nos travaux ne permettent pas d'en préférer une.

Un peptide antagoniste spécifique de Gp96 a été employé pour étudier le rôle de Gp96 dans le diabète insulino-dépendant (Ochayon et al., 2013). Nous sommes entrés en collaboration avec cette équipe pour tester le peptide dans notre modèle murin de GvH aiguë. Les résultats sont malheureusement difficiles à interpréter car le traitement a montré une toxicité sur des souris du groupe BM (ne développant pas la GvH). Bien que les souris Gp96^{-/-} meurent *in utero*, des techniques ont permis d'induire une déficience de Gp96 chez des souris (Mittal and Prasadarao, 2011; Zhang et al., 2015). Il serait intéressant d'utiliser une de ces méthodes dans le modèle de GvH aiguë afin de mieux appréhender l'impact de Gp96 dans la pathologie. Toutefois, il ne serait pas possible de discriminer l'effet de l'interaction de Gp96 à C3 de tous les autres effets potentiels de Gp96.

Quand des souris de génotype sauvage ont reçu une greffe de donneuses C3^{-/-}, la GvH a été plus sévère, et l'expression sérique de Gp96 et de C3 à J7 plus élevée (Figure 6B de l'article 2). Il est intéressant de remarquer que les souris recevant une greffe C3^{-/-} sans splénocytes, donc ne développant pas la GvH, présentent peu de Gp96 dans leur sérum, comme attendu, mais une forte quantité de C3. Les souris recevant le même type de greffe, mais de donneuses sauvages, présentent autant de Gp96, encore une fois comme attendu, mais nettement moins de C3. Cela suggère que les cellules de moelle osseuse de souris C3^{-/-} sont responsables de cette différence. Les cellules de moelle osseuse produisent très peu de C3, comme en atteste la Figure 6A de l'article 2, où l'on peut voir la production de C3, sept jours après allogreffe, dans des souris C3^{-/-} greffées par des cellules de moelle osseuse de souris sauvages. Il se pourrait donc que les cellules de moelle osseuse de souris C3^{-/-} manquent d'un régulateur cellulaire de C3 favorisant normalement sa dégradation. Nous avons retrouvé DAF sur différentes populations de splénocytes de souris C3^{-/-} (données non montrées), excluant une dérégulation du complément par déficit en ce récepteur. Chez l'homme, MCP, récepteur présent à la

membrane de très nombreux types cellulaires, mais absent des globules rouges, assiste le clivage de C3b par le facteur I. Il serait intéressant de vérifier, sur les érythrocytes des souris C3^{-/-}, l'expression du *CRI-related gene/protein y* (Crry), principal régulateur du complément chez la souris (Xu et al., 2000), considéré comme l'homologue fonctionnel de MCP (Li et al., 1993) et présent à la surface des érythrocytes. La raison de l'aggravation de la GvH chez des souris recevant un greffon C3^{-/-} n'est pas strictement élucidée. Mais comme nous le savons, C3, *via* son anaphylatoxine C3a, favorise la GvH notamment par activation des lymphocytes T (Cravedi et al., 2013; Kwan et al., 2012). Il se pourrait donc que la surexpression de C3 chez ces souris soit responsable de cette sévérité, qui conduit alors à une forte libération de Gp96 par les tissus endommagés.

Endormie parmi les tigres sauvages

William Blake

La GvH est une complication de l'alloCH, une thérapeutique d'une très grande complexité. La meilleure thérapie contre la GvH serait de dépléter les lymphocytes T du greffon, mais elle supprimerait l'action immunologique de l'alloCH, indispensable à son efficacité (Ram and Storb, 2013). Jaglowski et ses collaborateurs déplorent que, hormis dans le choix du donneur, peu de progrès aient été faits ces vingt dernières années dans la prise en charge du patient allogreffé, et identifient trois causes à cela : notre compréhension encore pauvre de la physiopathologie de la GvH, aiguë comme chronique, la subjectivité de l'évaluation du degré de la pathologie et le manque de standardisation des essais cliniques (Jaglowski and Devine, 2014). Les HSP90 présentent un potentiel intéressant. Nous montrons que les HSP90 cytosoliques et Gp96 jouent un rôle dans la GvH, qu'il reste à étayer, suggérons que Gp96 pourrait servir de biomarqueur de sévérité et de l'atteinte intestinale, et les inhibiteurs de HSP90, déjà testés en essais cliniques (Hong et al., 2013), de traitement prophylactique.

Si la protection de l'intestin est déjà envisagée dans la prophylaxie de la GvH (Holtan et al., 2014), le mode d'action de la 17AAG est original : il aide des cellules stratégiques dans la GvH à survivre malgré le stress. Aujourd'hui, la plupart des médicaments employés ou testés dans la prophylaxie de la GvH sont des immunosuppresseurs et des traitements cellulaires (Tableau II et

(Blazar et al., 2012). Mais, à la différence de la prophylaxie après une transplantation rénale ou cardiaque, additionner les immunosuppresseurs à mécanismes d'action différents pourrait ne pas convenir à la prise en charge de la GvH. Une thérapie combinant plusieurs médicaments ciblant différents niveaux de la physiopathologie de la GvH, avec par exemple un immunosuppresseur, un modulateur des DAMP, un probiotique ou un agent bactériostatique (Fuji et al., 2014; Shono et al., 2015), et peut-être un inhibiteur de HSP90, pourrait s'avérer plus efficace.

Bien que ses conclusions soient encore floues, l'article 2 pourrait aussi ouvrir des perspectives nouvelles dans la prophylaxie de la GvH. Si l'effet régulateur de l'inflammation dû à l'interaction de Gp96 avec C3b est confirmé, il serait intéressant de tester l'administration préventive de Gp96 après alloCH. Elle pourrait se traduire par une inhibition de la formation de C3b et C3a, que l'on sait primordiaux dans l'activation immunitaire. Il a déjà été montré que l'inhibition pharmacologique de C3 réduit la prolifération des lymphocytes T dans une réaction lymphocytaire mixte (Ma et al., 2014), c'est-à-dire une alloréaction entre des lymphocytes T d'un donneur et des cellules dendritiques d'un autre donneur, modèle *ex vivo* pour la GvH. L'antagoniste employé était la compstatine, un peptide synthétique (Sahu et al., 1996) se fixant à des domaines de la chaîne β de C3 et ses fragments et empêchant ainsi l'interaction de C3 avec la convertase de C3 de la voie alterne (Janssen et al., 2007). Bien que le mécanisme d'action soit différent, l'effet est similaire à celui que nous supposons de la liaison de Gp96 à C3.

Gp96 a été envisagée comme traitement le plus souvent sur la base de son rôle dans l'immunité adaptative, comme adjuvant de vaccination d'abord dans le cancer puis dans les rejets de greffe et les maladies auto-immunes (Randazzo et al., 2012; Seignez et al., 2014; Strbo et al., 2013). Il a en effet été montré que ce rôle dépend de sa concentration (au moins quand il s'agit d'immunisations par une préparation purifiée de Gp96), sans que les mécanismes en soient tirés au clair (Chandawarkar et al., 1999) ; de fortes doses de Gp96 favoriseraient une réponse immunitaire de tolérance, des doses plus faibles une activation immunitaire. Dans la physiopathologie de la GvH, Gp96 sécrétée par les tissus pourrait lier les CPA du receveur ou du donneur, induisant *in fine* la présentation des peptides chaperonnés aux lymphocytes T du donneur. Selon la concentration de Gp96, cela pourrait accentuer la réponse immunitaire allogénique, ou au contraire, sécrétée à haute dose dans ce contexte très

inflammatoire, tenter d'induire la tolérance envers le receveur. Dans un modèle murin d'alloCH, il a été montré qu'une vaccination basée sur des injections de Gp96 issue de lymphome favorise l'effet GvL et la lutte anti-infectieuse (Newman et al., 2014) ; mais pour l'instant, aucune vaccination basée sur Gp96 issue de tissus normaux du receveur pour induire la tolérance n'a été étudiée dans la GvH.

Nous avons testé, dans un modèle de GvH avec des receveuses BALB/c et des donneuses C57BL/6, la vaccination par une préparation de Gp96 purifiée (Srivastava, 1997) à partir de foies et de rates de BALB/c. L'objectif était d'induire la tolérance des cellules immunitaires du greffon par de fortes doses de Gp96 du receveur. Sur la base de protocoles induisant la tolérance dans un modèle murin de cancer (Chandawarkar et al., 1999) et un modèle de transplantation cardiaque chez le rat (Slack et al., 2007), et après adaptation au modèle murin de GvH aiguë, nous avons opté pour tester des doses de 10 µg injectées par voie intradermique le jour de l'alloCH et deux jours après. La survie et le score clinique (Cooke et al., 1996) des receveuses étaient suivis. La Figure 14 (non publiée) présente le résultat de la survie. Nous observons une meilleure survie moyenne lorsque les souris sont immunisées par la préparation purifiée de Gp96, mais qui n'est pas significative ($p = 0,1016$). Nous éprouvons malheureusement beaucoup de difficultés à obtenir des préparations de Gp96 de qualité, alliant pureté et quantité. De surcroît, le dosage de Gp96 dans ces préparations n'est pas standardisé et peut être source d'erreurs (Seigneur et al., 2014). Enfin, le modèle de GvH aiguë est très lourd ; en particulier, l'étape d'irradiation est parfois mal supportée par les souris, pouvant occasionner une mortalité dans les premiers jours de l'expérience. Pour toutes ces raisons nous ne sommes pas encore arrivés au terme de cet aspect de nos travaux.

Si des injections de Gp96 conféraient vraiment une protection contre la GvH, il serait difficile de déterminer quelle fonction de Gp96 est à l'œuvre : tolérance par présentation des peptides des receveuses aux lymphocytes T des donneuses, ou réduction du pouvoir inflammatoire de C3, ou encore autrement peut-être ? La première hypothèse pourrait être examinée en testant, dans le même modèle, une préparation de Gp96 issue d'une autre source que les souris BALB/c : si la protection était annihilée, ce serait qu'elle reposait sur la spécificité des peptides chaperonnés. Dans ce cas, la vaccination par une préparation de Gp96 purifiée à partir d'une biopsie du patient receveur pourrait être envisagée, à la condition qu'elle soit techniquement réalisable ; elle pourrait induire la tolérance

des lymphocytes T du greffon, piste de recherche très en vogue (Alpdogan et al., 2013; Fuchs, 2014; Strober, 2014; Sykes, 2015). Dans le cas d'un effet protecteur aspécifique, il serait difficile d'identifier précisément le mécanisme. Cela serait toutefois très intéressant, car cela suggérerait que de la Gp96 recombinante, beaucoup plus facile à produire qu'une préparation purifiée à partir d'une biopsie du patient, pourrait être utilisée dans la prévention de la GvH.

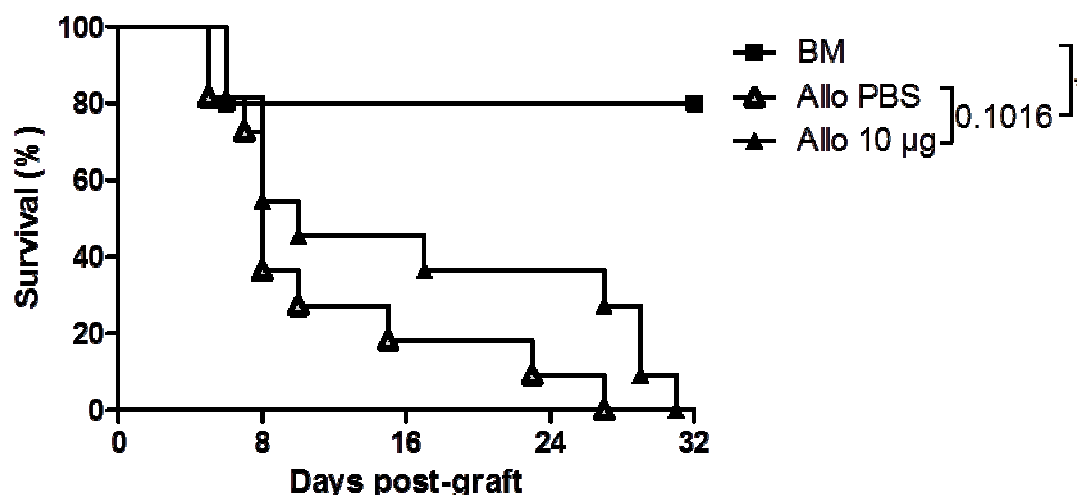


Figure 14 : Survie de souris développant la GvH et recevant des doses de préparation de Gp96.

Survie des souris receveuses BALB/c dans un modèle de GvH aiguë, selon qu'elles reçoivent de la moelle osseuse de souris C57BL/6 (BM, pas de GvH) ou de la moelle osseuse et des splénocytes de souris C57BL/6 (Allo, GvH). Les souris Allo ont reçu à J0 et J2 du PBS ou 10 µg de préparation purifiée de Gp96 issue de souris BALB/c. Le groupe BM contient cinq souris, les groupes Allo dix souris chacun. Le test statistique est un test de Mantel-Cox (ou *log-rank test*).

PERSPECTIVES

I) À propos de nos travaux

Deux études de grande ampleur chez l'homme pourraient voir le jour sur la base de nos travaux. La première serait thérapeutique et consisterait à tester la prévention de la GvH par une faible dose de 17AAG. La seconde serait diagnostique et consisterait à analyser la pertinence de Gp96 en tant que biomarqueur de sévérité, de l'atteinte intestinale et peut-être de pronostic, dans la GvH.

Nos résultats mettent en effet relation Gp96 avec la GvH intestinale. Nous projetons de vérifier la surexpression et la localisation exacte de Gp96 au niveau intestinal dans la GvH, dans le modèle murin de Gp96 et sur des biopsies de patients, ainsi que de chercher si elle participe à des phénomènes infectieux dans cette pathologie. Nous réfléchissons notamment à explorer la présence de LPS dans les sérums de patients dont nous disposons et son interaction avec Gp96. Nous sommes aussi intéressés par l'infection à *Clostridium difficile*, dont nous savons d'une part qu'elle est fréquente dans la GvH et d'autre part qu'elle peut impliquer Gp96.

L'association entre Gp96 et C3 pose encore beaucoup de questions. Il reste à déterminer si la conséquence en est une régulation du complément, donc de l'inflammation, comme nous sommes amenés à le supposer, notamment par mesure immunoenzymatique de la fixation du facteur B à C3b en présence de Gp96 et par cristallographie entre Gp96 et C3b. Par ailleurs, il serait intéressant de chercher si cette interaction survient et joue un rôle dans d'autres modèles, notamment la maladie de Crohn.

Induire la déficience en Gp96 chez des souris serait intéressant car cela permettrait de déterminer le rôle prépondérant de Gp96 dans la GvH aiguë.

Enfin, nous essayons de terminer notre étude sur la prévention de la GvH par des injections de fortes doses de préparation purifiée de Gp96.

II) Quelques perspectives plus abstraites

Rôle de Gp96 à la surface de pathogènes

L'effet de Gp96 propice à l'invasion de microorganismes a été retrouvé dans de nombreux secteurs de l'organisme : outre ce que nous avons déjà cité, Gp96 membranaire au niveau intestinal joue aussi un rôle d'ancrage dans l'invasion de *Listeria monocytogenes* (Cabanès et al., 2005). Gp96 exprimée à la surface des cellules endothéliales du système nerveux central de souris favorise l'invasion de *Candida albicans* dans le cerveau (Liu et al., 2011). *Escherichia coli* K1 favorise l'expression de Gp96 à la surface des polynucléaires neutrophiles, à laquelle elle se lie ensuite, pénétrant alors dans le leucocyte et inhibant son action oxydante, et pouvant *in fine* aller infecter les méninges de l'hôte (Mittal and Prasadarao, 2011). Quelques exceptions ont toutefois été relevées : à la surface de cellules épithéliales, Gp96 lie *Neisseria gonorrhoeae* mais diminue son invasion, semblant agir comme un leurre vis-à-vis de la bactérie (Rechner et al., 2007). Le même rôle a été imputé à Gp96 vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, dont la protéine Bap lie l'HSP ; mais cette interaction permettrait à la bactérie d'éviter d'être internalisée et de s'organiser sous forme de biofilm, induisant des infections persistantes (Valle et al., 2012). Ces interactions résultent de la liaison de Gp96 avec des protéines de structure différente (Valle et al., 2012), suggérant que les bactéries citées, et peut-être beaucoup d'autres, produisent dans certaines conditions ces protéines pour accroître leur pouvoir pathogène en profitant de l'expression membranaire ou extracellulaire de Gp96.

Il est très intéressant de remarquer qu'un homologue de Gp96 a été découvert dans le protozoaire *Leishmania infantum* (Larreta et al., 2000). Il ne semble pas nécessaire à sa survie, mais agit aussi bien dans le RE du parasite pour accroître sa virulence (Descoteaux et al., 2002) que dans le secteur extracellulaire où il est immunogène (Hosseini et al., 2015; Larreta et al., 2000). À notre connaissance, la localisation de Gp96 à la surface de *Leishmania* n'a pas été reportée. Par ailleurs, *Staphylococcus aureus* est capable de sécréter SCIN, une protéine inhibitrice du complément

(Rooijakkers et al., 2007). SCIN se lie à C3b engagé avec Bb dans une convertase de C3 de la voie alterne et empêche l'interaction avec C3, inhibant la boucle d'amplification (Rooijakkers et al., 2007). Le site de liaison de SCIN à C3b est situé dans la même région que celui de Gp96. Ajouté au fait que l'effet de SCIN est extrêmement voisin (inhibition de l'interaction entre C3b avec C3bBb) de celui que nous suggérons pour Gp96 (inhibition de l'interaction entre C3b et B), le parallèle entre ces deux protéines intrigue. Des pathogènes pourraient sécréter Gp96, ou lier spécifiquement la Gp96 de l'hôte à leur surface, en vue d'échapper à l'action du complément. Cette hypothèse doit être étudiée. À cet effet, des tests de liaison de Gp96 aux genres bactériens dont l'interaction avec la protéine de stress a déjà été mise en lumière suivis d'une mise en contact avec du complément serait intéressante. Dans la GvH, des pathogènes intestinaux pourraient se servir de Gp96 pour envahir la circulation générale et échapper à l'action du complément, aggravant la sévérité de la maladie.

Ainsi, Gp96, en exerçant une même fonction d'inhibition de l'activation du complément, induirait des répercussions différentes selon le site en jeu. Au cours de la GvH, par cette fonction régulatrice, elle pourrait jouer un rôle délétère au niveau de l'intestin et un rôle protecteur dans le reste de l'organisme.

Les linéaments d'un système ?

Ces quelques derniers alinéas sont le résultat d'une recherche bibliographique qui se propose de mettre au jour des liens entre les différentes protéines abordées dans nos travaux. Ils font intervenir une nouvelle protéine : l'alpha-2-macroglobuline ($\alpha 2M$).

Les protéines C3, C4, C5 et $\alpha 2M$ appartiennent à la même superfamille. C3 et $\alpha 2M$ présentent une structure voisine, possèdent tous deux un groupement thioester et sont impliqués dans l'immunité innée. Parmi de nombreux rôles, $\alpha 2M$ se lie de façon covalente aux protéases sécrétées par les agents infectieux, déjouant ainsi un de leurs principaux facteurs de virulence (Sottrup-Jensen, 1989), par exemple les protéases qui ciblent le complément (Schenkein et al., 1995). Dans le cancer de la prostate, iC3b et C5 sont clivés par l'antigène spécifique de la prostate, lequel est inhibé par $\alpha 2M$ (Manning et al., 2013).

La clairance des complexes α 2M-protéase est assurée par le récepteur CD91 (Kristensen et al., 1990). Quoique le principal mécanisme d'endocytose de Gp96 par les CPA pourrait être une pinocytose après interaction avec des HSPG (Jockheck-Clark et al., 2010), CD91 a été proposé comme récepteur majeur de Gp96 (Binder et al., 2000), ainsi d'ailleurs que de HSP90 et HSP70 (Basu et al., 2001). Par ailleurs, α 2M est capable de lier des antigènes *in vitro* et, *via* CD91, d'induire leur présentation croisée, de façon analogue à Gp96 (Binder et al., 2001). Cette observation a conduit les auteurs à proposer que Gp96 servirait d'adjuvant pour des antigènes pris en charge dans le secteur intracellulaire et qu' α 2M assurerait cette fonction pour les antigènes pris en charge dans le secteur extracellulaire, interagissant toutes deux avec les CPA *via* CD91.

D'autre part, si les HSPG seuls peuvent induire la pinocytose de la protéine qu'ils lient, il a aussi été mis en évidence que les HSPG peuvent « concentrer » des ligands en vue de leur internalisation par CD91 (Mikhailenko et al., 1995). C'est notamment le cas pour la *C4b-binding protein*, régulateur de la convertase de C3 des voies classique et des lectines (Spijkers et al., 2008). Il est envisageable que la pinocytose *via* les HSPG d'une part, et que l'endocytose *via* CD91 après interaction avec les HSPG d'autre part, diffèrent par leurs conditions de survenue (type cellulaire, concentration de ligands...) et la prise en charge subséquente des ligands. En outre, à la surface des cellules épithéliales tubulaires du rein, les HSPG lient la properdine, un facteur du complément qui stabilise la convertase de C3 de la voie alterne (Zaferani et al., 2011).

Ces quelques rapprochements structurels et fonctionnels entre le complément, α 2M et Gp96, auxquelles il convient d'ajouter nos travaux, qui établissent que Gp96 et C3b peuvent s'associer, montrent des relations intrigantes entre ces protéines. De prochaines publications pourraient compléter ce panorama balbutiant et, peut-être, faire émerger un système basé sur ces protéines.

CONCLUSION

Nos travaux montrent l'importance des HSP90 cytosoliques et de Gp96 dans la GvH. Un traitement prophylactique par la 17AAG, un inhibiteur des HSP90, atténue la GvH sans empêcher la GvL. Cet effet est associé à une augmentation de l'épissage d'XBP-1, un facteur de transcription-clé de la réponse au stress du RE, dans les cellules épithéliales intestinales, ainsi qu'à une diminution des lésions de la muqueuse intestinale, une augmentation des cellules souches Lgr5+ et une augmentation des cellules de Paneth et de la production de défensines. Ces résultats suggèrent que la 17AAG ou d'autres inhibiteurs de HSP90 pourraient avoir leur place dans la prévention de la GvH.

La concentration sérique de Gp96 augmente à l'installation de la GvH aiguë dans un modèle murin et après diagnostic chez des patients développant la GvH ; elle semble corrélée à la sévérité de la maladie et à l'atteinte intestinale. À J7, dans les sérums de souris, Gp96 et C3 sont associés. Cette interaction est confirmée par expérience de double-hybride ; la chaîne $\alpha 1$ de C3 (fragment 749-954) est le fragment minimal d'interaction, tandis que Gp96 doit être entière pour s'associer. *Ex vivo* et *in vitro*, Gp96 extracellulaire inhibe la voie alterne et la voie classique du complément et l'opsonisation de bactéries, suggérant qu'elle pourrait être un régulateur du complément au cours de la GvH, voire au cours d'autres pathologies. Des expériences de GvH faisant intervenir des souris C3^{-/-} ont confirmé l'association du tandem Gp96-C3 sériques avec la sévérité de la maladie. Cependant, le rôle exact de Gp96 dans la GvH ne peut être déduit avec certitude à ce stade.

Une étude incluant un plus grand nombre de patients permettra de valider la pertinence de Gp96 sérique comme biomarqueur de sévérité et de l'atteinte intestinale dans la GvH. L'analyse immunohistochimique de l'expression de Gp96 au niveau de l'épithélium intestinal de patients sera réalisée en parallèle. Une étude biochimique et fonctionnelle plus poussée de l'interaction entre Gp96 et C3b, l'inhibition transitoire de Gp96 dans le modèle GvH et l'aboutissement des travaux sur l'administration de fortes doses de Gp96 pour prévenir la GvH devraient préciser son rôle dans la

physiopathologie et son éventuel intérêt comme cible thérapeutique. Ces recherches pourraient s'appliquer à d'autres situations pathologiques, notamment les MICI.

BIBLIOGRAPHIE

- Alford, S.K., Longmore, G.D., Stenson, W.F., and Kemper, C. (2008). CD46-induced immunomodulatory CD4+ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *J Immunol* 181, 2544-2555.
- Alonso, C.D., Treadway, S.B., Hanna, D.B., Huff, C.A., Neofytos, D., Carroll, K.C., and Marr, K.A. (2012). Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54, 1053-1063.
- Alpdogan, O., Grosso, D., and Flomenberg, N. (2013). Recent advances in haploidentical stem cell transplantation. *Discovery medicine* 16, 159-165.
- Altmeyer, A., Maki, R.G., Feldweg, A.M., Heike, M., Protopopov, V.P., Masur, S.K., and Srivastava, P.K. (1996). Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *International journal of cancer Journal international du cancer* 69, 340-349.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Bamba, T., and Hosoda, S. (1993). Differential cytokine regulation of complement C3, C4, and factor B synthesis in human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *J Immunol* 151, 4239-4247.
- Anh-Tuan, N., Falus, A., Fust, G., Meretey, K., and Hollan, S.R. (1984). Appearance of covalently bound antigen in immune complexes formed during the activation of complement. *Journal of immunological methods* 75, 257-263.
- Arlet, J.B., Ribeil, J.A., Guillem, F., Negre, O., Hazoume, A., Marcion, G., Beuzard, Y., Dussiot, M., Moura, I.C., Demarest, S., *et al.* (2014). HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature* 514, 242-246.
- Aucagne, R., Droin, N., Paggetti, J., Lagrange, B., Largeot, A., Hammann, A., Bataille, A., Martin, L., Yan, K.P., Fenaux, P., *et al.* (2011). Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest* 121, 2361-2370.
- Ballen, K.K., King, R.J., Chitphakdithai, P., Bolan, C.D., Jr., Agura, E., Hartzman, R.J., and Kernan, N.A. (2008). The national marrow donor program 20 years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 14, 2-7.
- Barlow, M., Good, R.A., and Day, N.K. (1975). Complement in graft versus host disease: IL Depletion of complement components during a systemic graft versus host reaction in the rat (38499). *Proc Soc Exp Biol Med* 148, 170-176.
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *British medical journal* 2, 626-627.
- Barrett, A.J., Rezvani, K., Solomon, S., Dickinson, A.M., Wang, X.N., Stark, G., Cullup, H., Jarvis, M., Middleton, P.G., and Chao, N. (2003). New developments in allotransplant immunology. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 350-371.
- Bartel, G., Brown, K., Phillips, R., Peng, Q., Zhou, W., Sacks, S.H., and Wong, W. (2013). Donor specific transplant tolerance is dependent on complement receptors. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 26, 99-108.
- Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T., and Srivastava, P.K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14, 303-313.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., and Srivastava, P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *International immunology* 12, 1539-1546.
- Baudino, L., Sardini, A., Ruseva, M.M., Fossati-Jimack, L., Cook, H.T., Scott, D., Simpson, E., and Botto, M. (2014). C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in

enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 1503-1508.

Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., and Ron, D. (2001). Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J Clin Invest* *107*, 585-593.

Bexborn, F., Andersson, P.O., Chen, H., Nilsson, B., and Ekdahl, K.N. (2008). The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Molecular immunology* *45*, 2370-2379.

Bhat, R., Tummalapalli, S.R., and Rotella, D.P. (2014). Progress in the discovery and development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* *57*, 8718-8728.

Biamonte, M.A., Van de Water, R., Arndt, J.W., Scannevin, R.H., Perret, D., and Lee, W.C. (2010). Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials. *Journal of medicinal chemistry* *53*, 3-17.

Binder, R.J., Han, D.K., and Srivastava, P.K. (2000). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nature immunology* *1*, 151-155.

Binder, R.J., Karimeddini, D., and Srivastava, P.K. (2001). Adjuvanticity of alpha 2-macroglobulin, an independent ligand for the heat shock protein receptor CD91. *J Immunol* *166*, 4968-4972.

Blanc, C., Togarsimalemath, S.K., Chauvet, S., Le Quintrec, M., Moulin, B., Buchler, M., Jokiranta, T.S., Roumenina, L.T., Fremeaux-Bacchi, V., and Dragon-Durey, M.A. (2015). Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, two diseases. *J Immunol* *194*, 5129-5138.

Blazar, B.R., Murphy, W.J., and Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews Immunology* *12*, 443-458.

Block, M.S., Maurer, M.J., Goergen, K., Kalli, K.R., Erskine, C.L., Behrens, M.D., Oberg, A.L., and Knutson, K.L. (2015). Plasma immune analytes in patients with epithelial ovarian cancer. *Cytokine* *73*, 108-113.

Bolanos-Meade, J., and Vogelsang, G.B. (2004). Acute graft-versus-host disease. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* *2*, 672-682.

Bolhassani, A., Zahedifard, F., Taslimi, Y., Taghikhani, M., Nahavandian, B., and Rafati, S. (2009). Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients. *The Indian journal of medical research* *130*, 533-541.

Bradley, E., Zhao, X., Wang, R., Brann, D., Bieberich, E., and Wang, G. (2014). Low dose Hsp90 inhibitor 17AAG protects neural progenitor cells from ischemia induced death. *Journal of cell communication and signaling* *8*, 353-362.

Broere, F., van der Zee, R., and van Eden, W. (2011). Heat shock proteins are no DAMPs, rather 'DAMPERS'. *Nature reviews Immunology* *11*, 565; author reply 565.

Brunstein, C.G., Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Miller, J.S., Blazar, B.R., McGlave, P.B., and Wagner, J.E. (2007). Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* *110*, 3064-3070.

Cabanes, D., Sousa, S., Cebria, A., Lecuit, M., Garcia-del Portillo, F., and Cossart, P. (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO journal* *24*, 2827-2838.

Cambiaso, V., Gonzalez, M., Isamit, C., and Maccioni, R.B. (1999). The beta-isoform of heat shock protein hsp-90 is structurally related with human microtubule-interacting protein Mip-90. *FEBS letters* *457*, 343-347.

Carroll, M.C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology* *5*, 981-986.

Cawley, K., Deegan, S., Samali, A., and Gupta, S. (2011). Assays for detecting the unfolded protein response. *Methods Enzymol* *490*, 31-51.

Chaidos, A., Patterson, S., Szydlo, R., Chaudhry, M.S., Dazzi, F., Kanfer, E., McDonald, D., Marin, D., Milojkovic, D., Pavlu, J., *et al.* (2012). Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *119*, 5030-5036.

Chakrabarti, S., Lees, A., Jones, S.G., and Milligan, D.W. (2000). *Clostridium difficile* infection in allogeneic stem cell transplant recipients is associated with severe graft-versus-host disease and non-relapse mortality. *Bone marrow transplantation* *26*, 871-876.

Chakraverty, R., Cote, D., Buchli, J., Cotter, P., Hsu, R., Zhao, G., Sachs, T., Pitsillides, C.M., Bronson, R., Means, T., *et al.* (2006). An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *The Journal of experimental medicine* 203, 2021-2031.

Chandawarkar, R.Y., Wagh, M.S., Kovalchin, J.T., and Srivastava, P. (2004). Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. *International immunology* 16, 615-624.

Chandawarkar, R.Y., Wagh, M.S., and Srivastava, P.K. (1999). The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *The Journal of experimental medicine* 189, 1437-1442.

Chen, B.J., Deoliveira, D., Cui, X., Le, N.T., Son, J., Whitesides, J.F., and Chao, N.J. (2007). Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood* 109, 3115-3123.

Chen, Y., Chen, C., Ma, C., Sun, S., Zhang, J., and Sun, Y. (2015). Expression of heat-shock protein gp96 in gallbladder cancer and its prognostic clinical significance. *International journal of clinical and experimental pathology* 8, 1946-1953.

Cheuk, D.K. (2013). Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World journal of transplantation* 3, 99-112.

Choi, S.W., Braun, T., Chang, L., Ferrara, J.L., Pawarode, A., Magenau, J.M., Hou, G., Beumer, J.H., Levine, J.E., Goldstein, S., *et al.* (2014). Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *The Lancet Oncology* 15, 87-95.

Choi, S.W., and Reddy, P. (2014). Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nature reviews Clinical oncology* 11, 536-547.

Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nature cell biology* 10, 272-282.

Clarke, R., Cook, K.L., Hu, R., Facey, C.O., Tavassoly, I., Schwartz, J.L., Baumann, W.T., Tyson, J.J., Xuan, J., Wang, Y., *et al.* (2012). Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer research* 72, 1321-1331.

Clemenza, L., and Isenman, D.E. (2000). Structure-guided identification of C3d residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). *J Immunol* 165, 3839-3848.

Collins, C.B., Aherne, C.M., Yeckes, A., Pound, K., Eltzschig, H.K., Jedlicka, P., and de Zoeten, E.F. (2013). Inhibition of N-terminal ATPase on HSP90 attenuates colitis through enhanced Treg function. *Mucosal immunology* 6, 960-971.

Colten, H.R., and Dowton, S.B. (1986). Regulation of complement gene expression. *Biochemical Society symposium* 51, 37-46.

Contassot, E., Murphy, W., Angonin, R., Pavy, J.J., Bittencourt, M.C., Robinet, E., Reynolds, C.W., Cahn, J.Y., Herve, P., and Tiberghien, P. (1998). In vivo alloreactive potential of ex vivo-expanded primary T lymphocytes. *Transplantation* 65, 1365-1370.

Cooke, K.R., Gerbitz, A., Crawford, J.M., Teshima, T., Hill, G.R., Tesolin, A., Rossignol, D.P., and Ferrara, J.L. (2001). LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation* 107, 1581-1589.

Cooke, K.R., Hill, G.R., Crawford, J.M., Bungard, D., Brinson, Y.S., Delmonte, J., Jr., and Ferrara, J.L. (1998). Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 102, 1882-1891.

Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88, 3230-3239.

Copelan, E.A., Hamilton, B.K., Avalos, B., Ahn, K.W., Bolwell, B.J., Zhu, X., Aljurf, M., van Besien, K., Bredeson, C., Cahn, J.Y., *et al.* (2013). Better leukemia-free and overall survival in AML in first remission following cyclophosphamide in combination with busulfan compared with TBI. *Blood* 122, 3863-3870.

Cosio, F.G., Shen, X.P., Birmingham, D.J., Van Aman, M., and Hebert, L.A. (1990). Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *J Immunol* *145*, 4198-4206.

Couriel, D., Hosing, C., Saliba, R., Shpall, E.J., Andelini, P., Popat, U., Donato, M., and Champlin, R. (2006). Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* *12*, 37-40.

Couturier, M., Lamarthee, B., Arbez, J., Renauld, J.C., Bossard, C., Malard, F., Bonnefoy, F., Mohty, M., Perruche, S., Tiberghien, P., *et al.* (2013). IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia* *27*, 1527-1537.

Crane, C.A., Han, S.J., Ahn, B., Oehlke, J., Kivett, V., Fedoroff, A., Butowski, N., Chang, S.M., Clarke, J., Berger, M.S., *et al.* (2013). Individual patient-specific immunity against high-grade glioma after vaccination with autologous tumor derived peptides bound to the 96 KD chaperone protein. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 205-214.

Cravedi, P., Leventhal, J., Lakhani, P., Ward, S.C., Donovan, M.J., and Heeger, P.S. (2013). Immune cell-derived C3a and C5a costimulate human T cell alloimmunity. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* *13*, 2530-2539.

Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics* *79*, 129-168.

Cutler, C., and Antin, J.H. (2001). Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells* *19*, 108-117.

Daniels, G. (1989). Cromer-related antigens--blood group determinants on decay-accelerating factor. *Vox sanguinis* *56*, 205-211.

Davenport, E.L., Moore, H.E., Dunlop, A.S., Sharp, S.Y., Workman, P., Morgan, G.J., and Davies, F.E. (2007). Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood* *110*, 2641-2649.

de Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., Brunet, M., Maurel, S., Hammann, A., Ribeil, J.A., *et al.* (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood* *116*, 85-96.

Deeg, H.J. (2007). How I treat refractory acute GVHD. *Blood* *109*, 4119-4126.

Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., and Fearon, D.T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* *271*, 348-350.

Descoteaux, A., Avila, H.A., Zhang, K., Turco, S.J., and Beverley, S.M. (2002). Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *The EMBO journal* *21*, 4458-4469.

Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., *et al.* (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* *117*, 3921-3928.

Di Stasi, A., Tey, S.K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A.G., Grilley, B., *et al.* (2011). Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *The New England journal of medicine* *365*, 1673-1683.

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquelin, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolgne, N., Chiosis, G., *et al.* (2008). Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ* *15*, 859-866.

Dollins, D.E., Warren, J.J., Immormino, R.M., and Gewirth, D.T. (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Molecular cell* *28*, 41-56.

Doody, A.D., Kovalchin, J.T., Mihalyo, M.A., Hagymasi, A.T., Drake, C.G., and Adler, A.J. (2004). Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J Immunol* *172*, 6087-6092.

Dustin, M.L. (2001). Role of adhesion molecules in activation signaling in T lymphocytes. *Journal of clinical immunology* 21, 258-263.

Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C.G., Strober, S., and Negrin, R.S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature medicine* 9, 1144-1150.

Egorin, M.J., Rosen, D.M., Wolff, J.H., Callery, P.S., Musser, S.M., and Eiseman, J.L. (1998). Metabolism of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) by murine and human hepatic preparations. *Cancer research* 58, 2385-2396.

Elo, M.A., Kaarniranta, K., Helminen, H.J., and Lammi, M.J. (2005). Hsp90 inhibitor geldanamycin increases hsp70 mRNA stabilisation but fails to activate HSF1 in cells exposed to hydrostatic pressure. *Biochimica et biophysica acta* 1743, 115-119.

Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., *et al.* (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* 120, 223-231.

Eustace, B.K., Sakurai, T., Stewart, J.K., Yimlamai, D., Unger, C., Zehetmeier, C., Lain, B., Torella, C., Henning, S.W., Beste, G., *et al.* (2004). Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nature cell biology* 6, 507-514.

Fang, Y., Xu, C., Fu, Y.X., Holers, V.M., and Molina, H. (1998). Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 160, 5273-5279.

Farooqi, A.A., Li, K.T., Fayyaz, S., Chang, Y.T., Ismail, M., Liaw, C.C., Yuan, S.S., Tang, J.Y., and Chang, H.W. (2015). Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 5743-5752.

Fearon, D.T. (1978). Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 1971-1975.

Ferrara, J.L., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Holler, E., Teshima, T., Levine, J.E., Choi, S.W., Huber, E., Landfried, K., *et al.* (2011). Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118, 6702-6708.

Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550-1561.

Flowers, M.E., Inamoto, Y., Carpenter, P.A., Lee, S.J., Kiem, H.P., Petersdorf, E.W., Pereira, S.E., Nash, R.A., Mielcarek, M., Fero, M.L., *et al.* (2011). Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 117, 3214-3219.

Forneris, F., Ricklin, D., Wu, J., Tzekou, A., Wallace, R.S., Lambris, J.D., and Gros, P. (2010). Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science* 330, 1816-1820.

Fremaux-Bacchi, V., Miller, E.C., Liszewski, M.K., Strain, L., Blouin, J., Brown, A.L., Moghal, N., Kaplan, B.S., Weiss, R.A., Lhotta, K., *et al.* (2008). Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 112, 4948-4952.

Fuchs, E.J. (2014). Transplantation tolerance: from theory to clinic. *Immunological reviews* 258, 64-79.

Fuji, S., Kapp, M., and Einsele, H. (2014). Possible implication of bacterial infection in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in oncology* 4, 89.

Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature reviews Immunology* 2, 346-353.

Garg, A.D., Dudek, A.M., and Agostinis, P. (2013). Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *Biofactors* 39, 355-367.

Garrido, C., and Solary, E. (2003). A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell death and differentiation* 10, 619-620.

Ge, J., Normant, E., Porter, J.R., Ali, J.A., Dembski, M.S., Gao, Y., Georges, A.T., Grenier, L., Pak, R.H., Patterson, J., *et al.* (2006). Design, synthesis, and biological evaluation of hydroquinone

derivatives of 17-amino-17-demethoxygeldanamycin as potent, water-soluble inhibitors of Hsp90. *Journal of medicinal chemistry* 49, 4606-4615.

Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.

Ghannam, A., Pernollet, M., Fauquert, J.L., Monnier, N., Ponard, D., Villiers, M.B., Peguet-Navarro, J., Tridon, A., Lunardi, J., Gerlier, D., *et al.* (2008). Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells. *J Immunol* 181, 5158-5166.

Goodyear, O.C., Dennis, M., Jilani, N.Y., Loke, J., Siddique, S., Ryan, G., Nunnick, J., Khanum, R., Raghavan, M., Cook, M., *et al.* (2012). Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 119, 3361-3369.

Goral, J., Shenoy, S., Mohanakumar, T., and Clancy, J., Jr. (2002). Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. *Clinical and experimental immunology* 127, 553-559.

Gordon, D.L., Rice, J., Finlay-Jones, J.J., McDonald, P.J., and Hostetter, M.K. (1988). Analysis of C3 deposition and degradation on bacterial surfaces after opsonization. *The Journal of infectious diseases* 157, 697-704.

Goyal, R.K., Goyal, M., and Sankaranarayan, K. (2015). Grading acute graft-versus-host disease: time to reconsider. *Pediatric transplantation* 19, 252-254.

Gros, P., Milder, F.J., and Janssen, B.J. (2008). Complement driven by conformational changes. *Nature reviews Immunology* 8, 48-58.

Hallstrom, T., Nordstrom, T., Tan, T.T., Manolov, T., Lambris, J.D., Isenman, D.E., Zipfel, P.F., Blom, A.M., and Riesbeck, K. (2011). Immune evasion of *Moraxella catarrhalis* involves ubiquitous surface protein A-dependent C3d binding. *J Immunol* 186, 3120-3129.

Halstensen, T.S., Mollnes, T.E., Garred, P., Fausa, O., and Brandtzaeg, P. (1992). Surface epithelium related activation of complement differs in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 33, 902-908.

Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., *et al.* (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339-350.

Harboe, M., Ulvund, G., Vien, L., Fung, M., and Mollnes, T.E. (2004). The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clinical and experimental immunology* 138, 439-446.

Heeger, P.S., Lalli, P.N., Lin, F., Valujskikh, A., Liu, J., Muqim, N., Xu, Y., and Medof, M.E. (2005). Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *The Journal of experimental medicine* 201, 1523-1530.

Hellwage, J., Jokiranta, T.S., Friese, M.A., Wolk, T.U., Kampen, E., Zipfel, P.F., and Meri, S. (2002). Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H. *J Immunol* 169, 6935-6944.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Jr., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124, 915-927.

Hershberg, R.M., Framson, P.E., Cho, D.H., Lee, L.Y., Kovats, S., Beitz, J., Blum, J.S., and Nepom, G.T. (1997). Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *The Journal of clinical investigation* 100, 204-215.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L. (1997). Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90, 3204-3213.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-2759.

Hodorova, I., Rybarova, S., Solar, P., Vecanova, J., Prokopcakova, L., Bohus, P., Solarova, Z., Mellova, Y., and Schmidtova, K. (2008). Gp96 and its different expression in breast carcinomas. *Neoplasma* 55, 31-35.

Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P.J., Hahn, J., Eissner, G., Scholmerich, J., and Andreesen, R. (2004). Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 104, 889-894.

Holtan, S.G., Pasquini, M., and Weisdorf, D.J. (2014). Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood* 124, 363-373.

Hong, D.S., Banerji, U., Tavana, B., George, G.C., Aaron, J., and Kurzrock, R. (2013). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer treatment reviews* 39, 375-387.

Hongo, D., Tang, X., Dutt, S., Nador, R.G., and Strober, S. (2012). Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants. *Blood* 119, 1581-1589.

Hosseini, M., Haji Fatahaliha, M., Aghebati-Maleki, L., Movassagh Pour, A., Rafati, S., Seifi-Najmi, M., Younesi, V., Jadidi-Niaragh, F., and Yousefi, M. (2015). Recombinant Leishmania major lipophosphoglycan 3 activates human T-lymphocytes via TLR2-independent pathway. *Journal of immunotoxicology*, 1-7.

Huang, Q.Q., Koessler, R.E., Birkett, R., Dorfleutner, A., Perlman, H., Haines, G.K., 3rd, Stehlik, C., Nicchitta, C.V., and Pope, R.M. (2012). Glycoprotein 96 perpetuates the persistent inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 64, 3638-3648.

Hunt, C., and Morimoto, R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 6455-6459.

Jacquier-Sarlin, M.R., Gabert, F.M., Villiers, M.B., and Colomb, M.G. (1995). Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment. *Immunology* 84, 164-170.

Jagasia, M., Greinix, H., Robin, M., Das-Gupta, E., Jacobs, R., Savani, B.N., Engelhardt, B.G., Kassim, A., Worel, N., Knobler, R., *et al.* (2013). Extracorporeal photopheresis versus anticytokine therapy as a second-line treatment for steroid-refractory acute GVHD: a multicenter comparative analysis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 19, 1129-1133.

Jaglowski, S.M., and Devine, S.M. (2014). Graft-versus-host disease: why have we not made more progress? *Current opinion in hematology* 21, 141-147.

Janssen, B.J., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J.D., and Gros, P. (2006). Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444, 213-216.

Janssen, B.J., Halff, E.F., Lambris, J.D., and Gros, P. (2007). Structure of compstatin in complex with complement component C3c reveals a new mechanism of complement inhibition. *The Journal of biological chemistry* 282, 29241-29247.

Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., and Gros, P. (2005). Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 437, 505-511.

Jarvis, M., Marzolini, M., Wang, X.N., Jackson, G., Sviland, L., and Dickinson, A.M. (2003). Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease. *Transplantation* 76, 849-853.

Jaspersen, L.K., Bucher, C., Panoskaltis-Mortari, A., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2009). Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 114, 5062-5070.

Jego, G., Hazoume, A., Seigneure, R., and Garrido, C. (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* 332, 275-285.

Jerome, V., Vourc'h, C., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1993). Cell cycle regulation of the chicken hsp90 alpha expression. *Experimental cell research* 205, 44-51.

Jia, X., Gan, C., Xiao, K., He, W., Zhang, T., Huang, C., Wu, X., Luo, G., Wang, X., Hu, J., *et al.* (2009). Detection of urinary biomarkers for early diagnosis of acute renal allograft rejection by proteomic analysis. *Proteomics Clinical applications* 3, 694-704.

Jockheck-Clark, A.R., Bowers, E.V., Totonchy, M.B., Neubauer, J., Pizzo, S.V., and Nicchitta, C.V. (2010). Re-examination of CD91 function in GRP94 (glycoprotein 96) surface binding, uptake, and peptide cross-presentation. *J Immunol* 185, 6819-6830.

Joly, A.L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., and Garrido, C. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of innate immunity* 2, 238-247.

Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., *et al.* (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development* (Cambridge, England).

Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell stress & chaperones* 14, 105-111.

Kanda, Y., Kanda, J., Atsuta, Y., Fuji, S., Maeda, Y., Ichinohe, T., Takanashi, M., Ohashi, K., Fukuda, T., Miyamura, K., *et al.* (2014). Changes in the clinical impact of high-risk human leukocyte antigen allele mismatch combinations on the outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20, 526-535.

Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., *et al.* (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.

Kaser, A., Martinez-Naves, E., and Blumberg, R.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology* 26, 318-326.

Kekre, N., and Antin, J.H. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood* 124, 334-343.

Kemper, C., and Atkinson, J.P. (2007). T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nature reviews Immunology* 7, 9-18.

Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M., and Atkinson, J.P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421, 388-392.

Khan, F., Agarwal, A., and Agrawal, S. (2004). Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone marrow transplantation* 34, 1-12.

Kitamura, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *American journal of physiology Renal physiology* 295, F323-334.

Kittan, N.A., and Hildebrandt, G.C. (2010). The chemokine system: a possible therapeutic target in acute graft versus host disease. *Current topics in microbiology and immunology* 341, 97-120.

Koc, S., Leisenring, W., Flowers, M.E., Anasetti, C., Deeg, H.J., Nash, R.A., Sanders, J.E., Witherspoon, R.P., Storb, R., Appelbaum, F.R., *et al.* (2002). Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood* 100, 48-51.

Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., *et al.* (2011). Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 365, 2055-2066.

Kostavasili, I., Sahu, A., Friedman, H.M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., and Lambris, J.D. (1997). Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J Immunol* 158, 1763-1771.

Kotwal, G.J., Isaacs, S.N., McKenzie, R., Frank, M.M., and Moss, B. (1990). Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250, 827-830.

Kovalchin, J.T., Mendonca, C., Wagh, M.S., Wang, R., and Chandawarkar, R.Y. (2006). In vivo treatment of mice with heat shock protein, gp 96, improves survival of skin grafts with minor and major antigenic disparity. *Transplant immunology* 15, 179-185.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Don, A.L., Lineburg, K.E., Cheong, M., Robb, R.J., Markey, K.A., *et al.* (2012). Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nature medicine* 18, 135-142.

Kristensen, T., Moestrup, S.K., Gliemann, J., Bendtsen, L., Sand, O., and Sottrup-Jensen, L. (1990). Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS letters* 276, 151-155.

Kwan, W.H., Hashimoto, D., Paz-Artal, E., Ostrow, K., Greter, M., Raedler, H., Medof, M.E., Merad, M., and Heeger, P.S. (2012). Antigen-presenting cell-derived complement modulates graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* 122, 2234-2238.

Kwan, W.H., van der Touw, W., Paz-Artal, E., Li, M.O., and Heeger, P.S. (2013). Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 210, 257-268.

Larreta, R., Soto, M., Alonso, C., and Requena, J.M. (2000). Leishmania infantum: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Experimental parasitology* 96, 108-115.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., *et al.* (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-1586.

Lee, L.Y., Hook, M., Haviland, D., Wetsel, R.A., Yonter, E.O., Syribeys, P., Vernachio, J., and Brown, E.L. (2004). Inhibition of complement activation by a secreted Staphylococcus aureus protein. *The Journal of infectious diseases* 190, 571-579.

Levine, J.E., Hogan, W.J., Harris, A.C., Litzow, M.R., Efebera, Y.A., Devine, S.M., Reshef, R., and Ferrara, J.L. (2014). Improved accuracy of acute graft-versus-host disease staging among multiple centers. *Best practice & research Clinical haematology* 27, 283-287.

Levine, J.E., Huber, E., Hammer, S.T., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Ferrara, J.L., and Holler, E. (2013). Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood* 122, 1505-1509.

Lewis, L.A., Ngampasutadol, J., Wallace, R., Reid, J.E., Vogel, U., and Ram, S. (2010). The meningococcal vaccine candidate neisserial surface protein A (NspA) binds to factor H and enhances meningococcal resistance to complement. *PLoS pathogens* 6, e1001027.

Li, B., Sallee, C., Dehoff, M., Foley, S., Molina, H., and Holers, V.M. (1993). Mouse Crry/p65. Characterization of monoclonal antibodies and the tissue distribution of a functional homologue of human MCP and DAF. *J Immunol* 151, 4295-4305.

Li, H., Demetris, A.J., McNiff, J., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Rothstein, D.M., Lakkis, F.G., and Shlomchik, W.D. (2012). Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol* 188, 3804-3811.

Li, W., Tsen, F., Sahu, D., Bhatia, A., Chen, M., Multhoff, G., and Woodley, D.T. (2013a). Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *International review of cell and molecular biology* 303, 203-235.

Li, X., Liu, Z., Yan, X., Zhang, X., Li, Y., Zhao, B., Wang, S., Zhou, X., Gao, G.F., and Meng, S. (2013b). Induction of regulatory T cells by high-dose gp96 suppresses murine liver immune hyperactivation. *PloS one* 8, e68997.

Li, X., Sun, L., Hou, J., Gui, M., Ying, J., Zhao, H., Lv, N., and Meng, S. (2015). Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 137, 512-524.

Li, X.C., Jevnikar, A.M., and Grant, D.R. (1997). Expression of functional ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules by an immortalized epithelial cell clone derived from the small intestine. *Cell Immunol* 175, 58-66.

Lin, F., Spencer, D., Hatala, D.A., Levine, A.D., and Medof, M.E. (2004). Decay-accelerating factor deficiency increases susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis: role for complement in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 172, 3836-3841.

Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 318, 944-949.

Linderth, N.A., Popowicz, A., and Sastry, S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *The Journal of biological chemistry* 275, 5472-5477.

Liszewski, M.K., Kolev, M., Le Friec, G., Leung, M., Bertram, P.G., Fara, A.F., Subias, M., Pickering, M.C., Drouet, C., Meri, S., *et al.* (2013). Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. *Immunity* 39, 1143-1157.

Liu, B., and Li, Z. (2008). Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin. *Blood* 112, 1223-1230.

Liu, B., Yang, Y., Qiu, Z., Staron, M., Hong, F., Li, Y., Wu, S., Hao, B., Bona, R., Han, D., *et al.* (2010). Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nature communications* 1, 79.

Liu, E.S., and Lee, A.S. (1991). Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic acids research* 19, 5425-5431.

Liu, Y., Mittal, R., Solis, N.V., Prasadara, N.V., and Filler, S.G. (2011). Mechanisms of *Candida albicans* trafficking to the brain. *PLoS pathogens* 7, e1002305.

Lv, M., Ye, H.G., Zhao, X.S., Zhao, X.Y., Chang, Y.J., Liu, D.H., Xu, L.P., and Huang, X.J. (2013). Ceruloplasmin is a potential biomarker for aGVHD following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PloS one* 8, e58735.

Ma, Q., Li, D., Carreno, R., Patenia, R., Tsai, K.Y., Xydes-Smith, M., Alousi, A.M., Champlin, R.E., Sale, G.E., and Afshar-Kharghan, V. (2014). Complement component C3 mediates Th1/Th17 polarization in human T-cell activation and cutaneous GVHD. *Bone marrow transplantation* 49, 972-976.

Ma, Q., Li, D., Nurieva, R., Patenia, R., Bassett, R., Cao, W., Alekseev, A.M., He, H., Molldrem, J.J., Kroll, M.H., *et al.* (2012). Reduced graft-versus-host disease in C3-deficient mice is associated with decreased donor Th1/Th17 differentiation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 18, 1174-1181.

MacMillan, M.L., Weisdorf, D.J., Wagner, J.E., DeFor, T.E., Burns, L.J., Ramsay, N.K., Davies, S.M., and Blazar, B.R. (2002). Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 8, 387-394.

Magenau, J., and Reddy, P. (2014). Next generation treatment of acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 28, 2283-2291.

Magenau, J.M., Qin, X., Tawara, I., Rogers, C.E., Kitko, C., Schlough, M., Bickley, D., Braun, T.M., Jang, P.S., Lowler, K.P., *et al.* (2010). Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 16, 907-914.

Malard, F., and Mohty, M. (2014). New insight for the diagnosis of gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Mediators of inflammation* 2014, 701013.

Mann, M., and Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* 21, 255-261.

Manning, M.L., Williams, S.A., Jelinek, C.A., Kostova, M.B., and Denmeade, S.R. (2013). Proteolysis of complement factors iC3b and C5 by the serine protease prostate-specific antigen in prostatic fluid and seminal plasma. *J Immunol* 190, 2567-2574.

Marcu, M.G., Doyle, M., Bertolotti, A., Ron, D., Hendershot, L., and Neckers, L. (2002). Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Molecular and cellular biology* 22, 8506-8513.

Martin, P.J., Schoch, G., Fisher, L., Byers, V., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Beatty, P.G., Doney, K., McDonald, G.B., Sanders, J.E., *et al.* (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76, 1464-1472.

Martires, K.J., Baird, K., Steinberg, S.M., Grkovic, L., Joe, G.O., Williams, K.M., Mitchell, S.A., Datiles, M., Hakim, F.T., Pavletic, S.Z., *et al.* (2011). Sclerotic-type chronic GVHD of the skin: clinical risk factors, laboratory markers, and burden of disease. *Blood* 118, 4250-4257.

Marzec, M., Eletto, D., and Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 774-787.

Matsumoto, A.K., Kopicky-Burd, J., Carter, R.H., Tuveson, D.A., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1991). Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *The Journal of experimental medicine* 173, 55-64.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301-305.

Mazzarella, R.A., and Green, M. (1987). ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP94). *The Journal of biological chemistry* 262, 8875-8883.

Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology* 6, 257.

Mikhailenko, I., Kounnas, M.Z., and Strickland, D.K. (1995). Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 270, 9543-9549.

Miller, W.P., Srinivasan, S., Panoskaltsis-Mortari, A., Singh, K., Sen, S., Hamby, K., Deane, T., Stempora, L., Beus, J., Turner, A., *et al.* (2010). GVHD after haploidentical transplantation: a novel, MHC-defined rhesus macaque model identifies CD28- CD8+ T cells as a reservoir of breakthrough T-cell proliferation during costimulation blockade and sirolimus-based immunosuppression. *Blood* 116, 5403-5418.

Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y.T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., *et al.* (2012). Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* 119, 5772-5781.

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Molecular and cellular biology* 14, 1459-1464.

Mittal, R., and Prasadara, N.V. (2011). gp96 expression in neutrophils is critical for the onset of *Escherichia coli* K1 (RS218) meningitis. *Nature communications* 2, 552.

Miyata, Y., Yoneda, Y., and Yahara, I. (2011). Stimulation of CK2-dependent Grp94 phosphorylation by the nuclear localization signal peptide. *Molecular and cellular biochemistry* 356, 191-200.

Mjahed, H., Girodon, F., Fontenay, M., and Garrido, C. (2012). Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental cell research* 318, 1946-1958.

Mohty, M., Malard, F., and Savani, B.N. (2015). High-dose total body irradiation and myeloablative conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation: time to rethink? *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 21, 620-624.

Morgan, M.J., Kim, Y.S., and Liu, Z.G. (2008). TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research* 18, 343-349.

Mosaad, Y.M. (2014). Immunology of hematopoietic stem cell transplant. *Immunological investigations* 43, 858-887.

Moser, C., Lang, S.A., and Stoeltzing, O. (2009). Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 29, 2031-2042.

Munoz, E., Vidarte, L., Pastor, C., Casado, M., and Vivanco, F. (1998). A small domain (6.5 kDa) of bacterial protein G inhibits C3 covalent binding to the Fc region of IgG immune complexes. *European journal of immunology* 28, 2591-2597.

Munro, S., and Pelham, H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.

Murphy, S., and Nguyen, V.H. (2011). Role of gut microbiota in graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 52, 1844-1856.

Na, X., Kim, H., Moyer, M.P., Pothoulakis, C., and LaMont, J.T. (2008). gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infection and immunity* 76, 2862-2871.

Nagler, A., Rocha, V., Labopin, M., Unal, A., Ben Othman, T., Campos, A., Volin, L., Poire, X., Aljurf, M., Masszi, T., *et al.* (2013). Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus Cy as conditioning regimen--a report from the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 3549-3556.

Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 64-76.

Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T., and Yokoyama, K. (1995). Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 233, 1-8.

Newman, R.G., Dee, M.J., Malek, T.R., Podack, E.R., and Levy, R.B. (2014). Heat shock protein vaccination and directed IL-2 therapy amplify tumor immunity rapidly following bone marrow transplantation in mice. *Blood* 123, 3045-3055.

Ning, H., Yang, F., Jiang, M., Hu, L., Feng, K., Zhang, J., Yu, Z., Li, B., Xu, C., Li, Y., *et al.* (2008). The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 22, 593-599.

Nishida, N., Walz, T., and Springer, T.A. (2006). Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19737-19742.

Ochayon, D.E., Mizrahi, M., Shahaf, G., Baranovski, B.M., and Lewis, E.C. (2013). Human alpha1-Antitrypsin Binds to Heat-Shock Protein gp96 and Protects from Endogenous gp96-Mediated Injury In vivo. *Frontiers in immunology* 4, 320.

Oikonomopoulou, K., DeAngelis, R.A., Chen, H., Diamandis, E.P., Hollenberg, M.D., Ricklin, D., and Lambris, J.D. (2013). Induction of complement C3a receptor responses by kallikrein-related peptidase 14. *J Immunol* 191, 3858-3866.

Oran, A.E., and Isenman, D.E. (1999). Identification of residues within the 727-767 segment of human complement component C3 important for its interaction with factor H and with complement receptor 1 (CR1, CD35). *The Journal of biological chemistry* 274, 5120-5130.

Ostrovsky, O., Makarewich, C.A., Snapp, E.L., and Argon, Y. (2009). An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11600-11605.

Paczesny, S. (2013). Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood* 121, 585-594.

Paczesny, S., Choi, S.W., and Ferrara, J.L. (2009a). Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies. *Current opinion in hematology* 16, 427-436.

Paczesny, S., Krijanovski, O.I., Braun, T.M., Choi, S.W., Clouthier, S.G., Kuick, R., Misek, D.E., Cooke, K.R., Kitko, C.L., Weyand, A., *et al.* (2009b). A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 113, 273-278.

Pagetta, A., Folda, A., Brunati, A.M., and Finotti, P. (2003). Identification and purification from the plasma of Type 1 diabetic subjects of a proteolytically active Grp94Evidence that Grp94 is entirely responsible for plasma proteolytic activity. *Diabetologia* 46, 996-1006.

Pantazis, P., Kalyanaraman, V.S., and Bing, D.H. (1990). Synthesis of the third component of complement (C3) by lectin-activated and HTLV-infected human T-cells. *Molecular immunology* 27, 283-289.

Patel, P.D., Yan, P., Seidler, P.M., Patel, H.J., Sun, W., Yang, C., Que, N.S., Taldone, T., Finotti, P., Stephani, R.A., *et al.* (2013). Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. *Nature chemical biology* 9, 677-684.

Pawaria, S., and Binder, R.J. (2011). CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nature communications* 2, 521.

Pearl, L.H., and Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual review of biochemistry* 75, 271-294.

Pekkarinen, P.T., Vaali, K., Jarva, H., Kekalainen, E., Hetemaki, I., Junnikkala, S., Helminen, M., Vaarala, O., Meri, S., and Arstila, T.P. (2013). Impaired intestinal tolerance in the absence of a functional complement system. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131, 1167-1175.

Pelicano, H., Carew, J.S., McQueen, T.J., Andreeff, M., Plunkett, W., Keating, M.J., and Huang, P. (2006). Targeting Hsp90 by 17-AAG in leukemia cells: mechanisms for synergistic and antagonistic drug combinations with arsenic trioxide and Ara-C. *Leukemia* 20, 610-619.

Penack, O., Holler, E., and van den Brink, M.R. (2010). Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 115, 1865-1872.

Peng, Q., Li, K., Anderson, K., Farrar, C.A., Lu, B., Smith, R.A., Sacks, S.H., and Zhou, W. (2008). Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction. *Blood* 111, 2452-2461.

Peng, Q., Li, K., Patel, H., Sacks, S.H., and Zhou, W. (2006). Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. *J Immunol* 176, 3330-3341.

Perrin-Cocon, L.A., Villiers, C.L., Salamero, J., Gabert, F., and Marche, P.N. (2004). B cell receptors and complement receptors target the antigen to distinct intracellular compartments. *J Immunol* 172, 3564-3572.

Pflieger, D., Chabane, S., Gaillard, O., Bernard, B.A., Ducoroy, P., Rossier, J., and Vinh, J. (2006). Comparative proteomic analysis of extracellular matrix proteins secreted by two types of skin fibroblasts. *Proteomics* 6, 5868-5879.

Piguet, P.F., Grau, G.E., Allet, B., and Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *The Journal of experimental medicine* 166, 1280-1289.

Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., and Strober, S. (2009). Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* 113, 4458-4467.

Poutsiaka, D.D., Munson, D., Price, L.L., Chan, G.W., and Snyderman, D.R. (2011). Blood stream infection (BSI) and acute GVHD after hematopoietic SCT (HSCT) are associated. *Bone marrow transplantation* 46, 300-307.

Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.S., and Li, L. (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS biology* 5, e172.

Przepiorka, D., Chan, K.W., Champlin, R.E., Culbert, S.J., Petropoulos, D., Ippoliti, C., Khouri, I., Huh, Y.O., Vreisinger, H., Deisseroth, A.B., *et al.* (1995). Prevention of graft-versus-host disease with anti-CD5 ricin A chain immunotoxin after CD3-depleted HLA-nonidentical marrow transplantation in pediatric leukemia patients. *Bone marrow transplantation* 16, 737-741.

Przepiorka, D., Ippoliti, C., Khouri, I., Woo, M., Mehra, R., Le Bherz, D., Giralt, S., Gajewski, J., Fischer, H., Fritsche, H., *et al.* (1996). Tacrolimus and minidose methotrexate for prevention of acute graft-versus-host disease after matched unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 88, 4383-4389.

Pulsipher, M.A., Chitphakdithai, P., Logan, B.R., Shaw, B.E., Wingard, J.R., Lazarus, H.M., Waller, E.K., Seftel, M., Stroncek, D.F., Lopez, A.M., *et al.* (2013). Acute toxicities of unrelated bone marrow versus peripheral blood stem cell donation: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 121, 197-206.

Ram, R., and Storb, R. (2013). Pharmacologic prophylaxis regimens for acute graft-versus-host disease: past, present and future. *Leukemia & lymphoma* 54, 1591-1601.

Ramadan, A., and Paczesny, S. (2015). Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. *Frontiers in immunology* 6, 14.

Ramadass, M., Ghebrehewet, B., and Kew, R.R. (2015). Enhanced recognition of plasma proteins in a non-native state by complement C3b. A possible clearance mechanism for damaged proteins in blood. *Molecular immunology* 64, 55-62.

Ramadass, M., Ghebrehewet, B., Smith, R.J., and Kew, R.R. (2014). Generation of multiple fluid-phase C3b:plasma protein complexes during complement activation: possible implications in C3 glomerulopathies. *J Immunol* 192, 1220-1230.

Randazzo, M., Terness, P., Opelz, G., and Kleist, C. (2012). Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *International journal of cancer Journal international du cancer* 130, 2219-2231.

Randolph, S.S., Gooley, T.A., Warren, E.H., Appelbaum, F.R., and Riddell, S.R. (2004). Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 103, 347-352.

Randow, F., and Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature cell biology* 3, 891-896.

Ranganathan, P., Heaphy, C.E., Costinean, S., Stauffer, N., Na, C., Hamadani, M., Santhanam, R., Mao, C., Taylor, P.A., Sandhu, S., *et al.* (2012). Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155. *Blood* 119, 4786-4797.

Rechner, C., Kuhlewein, C., Muller, A., Schild, H., and Rudel, T. (2007). Host glycoprotein Gp96 and scavenger receptor SREC interact with PorB of disseminating *Neisseria gonorrhoeae* in an epithelial invasion pathway. *Cell host & microbe* 2, 393-403.

Reed, R.C., Berwin, B., Baker, J.P., and Nicchitta, C.V. (2003). GRP94/gp96 elicits ERK activation in murine macrophages. A role for endotoxin contamination in NF-kappa B activation and nitric oxide production. *The Journal of biological chemistry* 278, 31853-31860.

Rerole, A.L., Gobbo, J., De Thonel, A., Schmitt, E., Pais de Barros, J.P., Hammann, A., Lanneau, D., Fourmaux, E., Demidov, O.N., Micheau, O., *et al.* (2011). Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research* 71, 484-495.

Ri, M., Tashiro, E., Oikawa, D., Shinjo, S., Tokuda, M., Yokouchi, Y., Narita, T., Masaki, A., Ito, A., Ding, J., *et al.* (2012). Identification of Toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing. *Blood cancer journal* 2, e79.

Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., *et al.* (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102-105.

Ricklin, D. (2012). Manipulating the mediator: modulation of the alternative complement pathway C3 convertase in health, disease and therapy. *Immunobiology* 217, 1057-1066.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J.D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* 11, 785-797.

Ricklin, D., and Lambris, J.D. (2015). Therapeutic control of complement activation at the level of the central component C3. *Immunobiology*.

Ricklin, D., Tzekou, A., Garcia, B.L., Hammel, M., McWhorter, W.J., Sfyroera, G., Wu, Y.Q., Holers, V.M., Herbert, A.P., Barlow, P.N., *et al.* (2009). A molecular insight into complement evasion by the staphylococcal complement inhibitor protein family. *J Immunol* 183, 2565-2574.

Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell stress & chaperones* 1, 97-98.

Rolhion, N., Barnich, N., Bringer, M.A., Glasser, A.L., Ranc, J., Hebutterne, X., Hofman, P., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion. *Gut* 59, 1355-1362.

Rooijackers, S.H., Milder, F.J., Bardoel, B.W., Ruyken, M., van Strijp, J.A., and Gros, P. (2007). Staphylococcal complement inhibitor: structure and active sites. *J Immunol* 179, 2989-2998.

Rosser, M.F., Trotta, B.M., Marshall, M.R., Berwin, B., and Nicchitta, C.V. (2004). Adenosine nucleotides and the regulation of GRP94-client protein interactions. *Biochemistry* 43, 8835-8845.

Rowe, V., Banovic, T., MacDonald, K.P., Kuns, R., Don, A.L., Morris, E.S., Burman, A.C., Bofinger, H.M., Clouston, A.D., and Hill, G.R. (2006). Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 108, 2485-2492.

Rubio, M.T., Moreira-Teixeira, L., Bachy, E., Bouillie, M., Milpied, P., Coman, T., Suarez, F., Marcais, A., Sibon, D., Buzyn, A., *et al.* (2012). Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* 120, 2144-2154.

Rutkowski, D.T., and Hegde, R.S. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *The Journal of cell biology* 189, 783-794.

Ruutu, T., Gratwohl, A., de Witte, T., Afanasyev, B., Apperley, J., Bacigalupo, A., Dazzi, F., Dreger, P., Duarte, R., Finke, J., *et al.* (2014). Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone marrow transplantation* 49, 168-173.

Sacks, S.H. (2010). Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. *European journal of immunology* 40, 668-670.

Sahu, A., Kay, B.K., and Lambris, J.D. (1996). Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J Immunol* 157, 884-891.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjoberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., *et al.* (2010). Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 11, 76-83.

Sandor, N., Pap, D., Prechl, J., Erdei, A., and Bajtay, Z. (2009). A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes. *Molecular immunology* 47, 438-448.

Sastry, S., and Linderroth, N. (1999). Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). *The Journal of biological chemistry* 274, 12023-12035.

Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340, 1190-1194.

Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

Schaiff, W.T., Hruska, K.A., Jr., McCourt, D.W., Green, M., and Schwartz, B.D. (1992). HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *The Journal of experimental medicine* 176, 657-666.

Schenkein, H.A., Fletcher, H.M., Bodnar, M., and Macrina, F.L. (1995). Increased opsonization of a prtH-defective mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83 is caused by reduced degradation of complement-derived opsonins. *J Immunol* 154, 5331-5337.

Schmidt, J., Klemp, C., Buchler, M.W., and Marten, A. (2006). Release of iC3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 55, 31-38.

Schneidawind, D., Pierini, A., Alvarez, M., Pan, Y., Baker, J., Buechele, C., Luong, R.H., Meyer, E.H., and Negrin, R.S. (2014). CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood* 124, 3320-3328.

Schroeder, M.A., and DiPersio, J.F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Disease models & mechanisms* 4, 318-333.

Seignez, A., Kohli, E., Garrido, C., and Seigneuric, R. (2014). Quantifying Gp96/Grp94 complexes preparations for vaccines: a key step often inaccurate. *Current medicinal chemistry* 21, 153-163.

Seo, Y.H. (2015). Organelle-specific Hsp90 inhibitors. *Archives of pharmacal research*.

Shi, Y., Mosser, D.D., and Morimoto, R.I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes & development* 12, 654-666.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412-415.

Shono, Y., Docampo, M.D., Peled, J.U., Perobelli, S.M., and Jenq, R.R. (2015). Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *International journal of hematology* 101, 428-437.

Singh-Jasuja, H., Scherer, H.U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H.G., Toes, R.E., and Schild, H. (2000a). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *European journal of immunology* 30, 2211-2215.

Singh-Jasuja, H., Toes, R.E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S.P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H.G., Arnold-Schild, D., *et al.* (2000b). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *The Journal of experimental medicine* 191, 1965-1974.

Sivula, J., Cordova, Z.M., Tuimala, J., Jaatinen, T., Partanen, J., Volin, L., and Turpeinen, H. (2012). Toll-like receptor gene polymorphisms confer susceptibility to graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Scandinavian journal of immunology* 76, 336-341.

Slack, L.K., Muthana, M., Hopkinson, K., Suvarna, S.K., Espigares, E., Mirza, S., Fairburn, B., and Pockley, A.G. (2007). Administration of the stress protein gp96 prolongs rat cardiac allograft survival, modifies rejection-associated inflammatory events, and induces a state of peripheral T-cell hyporesponsiveness. *Cell stress & chaperones* 12, 71-82.

Socie, G., and Ritz, J. (2014). Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 124, 374-384.

Solomon, S.R., Mielke, S., Savani, B.N., Montero, A., Wisch, L., Childs, R., Hensel, N., Schindler, J., Ghetie, V., Leitman, S.F., *et al.* (2005). Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* 106, 1123-1129.

Sorror, M., Maris, M., Diaconescu, R., and Storb, R. (2005). Lessened severe graft-versus-host after "minitransplantations". *Blood* 105, 2614.

Sottrup-Jensen, L. (1989). Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *The Journal of biological chemistry* 264, 11539-11542.

Spierings, E., and Goulmy, E. (2005). Expanding the immunotherapeutic potential of minor histocompatibility antigens. *The Journal of clinical investigation* 115, 3397-3400.

Spijkers, P.P., Denis, C.V., Blom, A.M., and Lenting, P.J. (2008). Cellular uptake of C4b-binding protein is mediated by heparan sulfate proteoglycans and CD91/LDL receptor-related protein. *European journal of immunology* 38, 809-817.

Srivastava, P. (2002a). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual review of immunology* 20, 395-425.

Srivastava, P. (2002b). Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology* 2, 185-194.

Srivastava, P.K. (1997). Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods* 12, 165-171.

Srivastava, P.K., DeLeo, A.B., and Old, L.J. (1986). Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3407-3411.

Staron, M., Wu, S., Hong, F., Stojanovic, A., Du, X., Bona, R., Liu, B., and Li, Z. (2011). Heat-shock protein gp96/grp94 is an essential chaperone for the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 117, 7136-7144.

Storb, R., Deeg, H.J., Whitehead, J., Appelbaum, F., Beatty, P., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift, R., Doney, K., Farewell, V., *et al.* (1986). Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *The New England journal of medicine* 314, 729-735.

Storb, R., Prentice, R.L., Buckner, C.D., Clift, R.A., Appelbaum, F., Deeg, J., Doney, K., Hansen, J.A., Mason, M., Sanders, J.E., *et al.* (1983). Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *The New England journal of medicine* 308, 302-307.

Strainic, M.G., Liu, J., Huang, D., An, F., Lalli, P.N., Muqim, N., Shapiro, V.S., Dubyak, G.R., Heeger, P.S., and Medof, M.E. (2008). Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity* 28, 425-435.

Strbo, N., Garcia-Soto, A., Schreiber, T.H., and Podack, E.R. (2013). Secreted heat shock protein gp96-Ig: next-generation vaccines for cancer and infectious diseases. *Immunologic research* 57, 311-325.

Strober, S. (2014). Path to clinical transplantation tolerance and prevention of graft-versus-host disease. *Immunologic research* 58, 240-248.

Stuehler, C., Mielke, S., Chatterjee, M., Duell, J., Lurati, S., Rueckert, F., Einsele, H., Bargou, R.C., and Topp, M.S. (2009). Selective depletion of alloreactive T cells by targeted therapy of heat shock protein 90: a novel strategy for control of graft-versus-host disease. *Blood* 114, 2829-2836.

Sugihara, T., Kobori, A., Imaeda, H., Tsujikawa, T., Amagase, K., Takeuchi, K., Fujiyama, Y., and Andoh, A. (2010). The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology* 160, 386-393.

Suriano, R., Ghosh, S.K., Ashok, B.T., Mittelman, A., Chen, Y., Banerjee, A., and Tiwari, R.K. (2005). Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention. *Cancer research* 65, 6466-6475.

Suriano, R., Ghosh, S.K., Chaudhuri, D., Mittelman, A., Banerjee, A., and Tiwari, R.K. (2009). Sialic acid content of tissue-specific gp96 and its potential role in modulating gp96-macrophage interactions. *Glycobiology* 19, 1427-1435.

Suto, R., and Srivastava, P.K. (1995). A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269, 1585-1588.

Sykes, M. (2015). Immune tolerance in recipients of combined haploidentical bone marrow and kidney transplantation. *Bone marrow transplantation* 50 Suppl 2, S82-86.

Takashima, S., Kadowaki, M., Aoyama, K., Koyama, M., Oshima, T., Tomizuka, K., Akashi, K., and Teshima, T. (2011). The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 285-294.

Tanabe, T., Yamaguchi, N., Matsuda, K., Yamazaki, K., Takahashi, S., Tojo, A., Onizuka, M., Eishi, Y., Akiyama, H., Ishikawa, J., *et al.* (2011). Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *International journal of hematology* 93, 771-778.

Testori, A., Richards, J., Whitman, E., Mann, G.B., Lutzky, J., Camacho, L., Parmiani, G., Tosti, G., Kirkwood, J.M., Hoos, A., *et al.* (2008). Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 955-962.

Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J.M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., *et al.* (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97, 63-72.

Tirosh, B., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., and Ploegh, H.L. (2006). Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* 281, 5852-5860.

Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology* 84, 389-398.

Tsan, M.F., and Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *Journal of leukocyte biology* 85, 905-910.

Tsutsumi, S., and Neckers, L. (2007). Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer science* 98, 1536-1539.

Tuncer, H.H., Rana, N., Milani, C., Darko, A., and Al-Homsi, S.A. (2012). Gastrointestinal and hepatic complications of hematopoietic stem cell transplantation. *World journal of gastroenterology : WJG* 18, 1851-1860.

Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penades, J.R., and Lasa, I. (2012). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS pathogens* 8, e1002843.

van Bekkum, D.W., and Knaan, S. (1977). Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *Journal of the National Cancer Institute* 58, 787-790.

van den Brink, M.R., and Burakoff, S.J. (2002). Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature reviews Immunology* 2, 273-281.

Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *The Journal of experimental medicine* 196, 1553-1561.

Verschoor, A., Brockman, M.A., Gadjeva, M., Knipe, D.M., and Carroll, M.C. (2003). Myeloid C3 determines induction of humoral responses to peripheral herpes simplex virus infection. *J Immunol* 171, 5363-5371.

Villiers, C.L., Cretin, F., Lefebvre, N., Marche, P.N., and Villiers, M.B. (2008). A new role for complement C3: regulation of antigen processing through an inhibitory activity. *Molecular immunology* 45, 3509-3516.

Vogen, S., Gidalevitz, T., Biswas, C., Simen, B.B., Stein, E., Gulmen, F., and Argon, Y. (2002). Radicicol-sensitive peptide binding to the N-terminal portion of GRP94. *The Journal of biological chemistry* 277, 40742-40750.

Waldman, E., Lu, S.X., Hubbard, V.M., Kochman, A.A., Eng, J.M., Terwey, T.H., Muriglan, S.J., Kim, T.D., Heller, G., Murphy, G.F., *et al.* (2006). Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood* 107, 1703-1711.

Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine* 344, 1058-1066.

Wanderling, S., Simen, B.B., Ostrovsky, O., Ahmed, N.T., Vogen, S.M., Gidalevitz, T., and Argon, Y. (2007). GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Molecular biology of the cell* 18, 3764-3775.

Wang, G., Krishnamurthy, K., and Tangpisuthipongsa, D. (2011). Protection of murine neural progenitor cells by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in the low nanomolar concentration range. *Journal of neurochemistry* 117, 703-711.

Wang, X., Wang, Q., and Lin, H. (2010). Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical & developmental immunology* 2010, 212537.

Warren, H.B., Pantazis, P., and Davies, P.F. (1987). The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *The American journal of pathology* 129, 9-13.

Wearsch, P.A., and Nicchitta, C.V. (1996). Purification and partial molecular characterization of GRP94, an ER resident chaperone. *Protein expression and purification* 7, 114-121.

Weber, C.K., Haslbeck, M., Englbrecht, M., Sehnert, B., Mielenz, D., Graef, D., Distler, J.H., Mueller, R.B., Burkhardt, H., Schett, G., *et al.* (2010). Antibodies to the endoplasmic reticulum-resident chaperones calnexin, BiP and Grp94 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 49, 2255-2263.

Weekes, M.P., Antrobus, R., Talbot, S., Hor, S., Simecek, N., Smith, D.L., Bloor, S., Randow, F., and Lehner, P.J. (2012). Proteomic plasma membrane profiling reveals an essential role for gp96 in the cell surface expression of LDLR family members, including the LDL receptor and LRP6. *Journal of proteome research* 11, 1475-1484.

Weis, J.J., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1984). Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 881-885.

Welniak, L.A., Blazar, B.R., and Murphy, W.J. (2007). Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual review of immunology* 25, 139-170.

Werner, T., Wagner, S.J., Martinez, I., Walter, J., Chang, J.S., Clavel, T., Kisling, S., Schuemann, K., and Haller, D. (2011). Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn's disease-like ileitis. *Gut* 60, 325-333.

Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M., Jr., Sistonen, L., and Morimoto, R.I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063-1066.

Westerhuis, G., van Pel, M., Toes, R.E., Staal, F.J., and Fibbe, W.E. (2011). Chimerism levels after stem cell transplantation are primarily determined by the ratio of donor to host stem cells. *Blood* 117, 4400-4401.

Westin, J.R., Saliba, R.M., De Lima, M., Alousi, A., Hosing, C., Qazilbash, M.H., Khouri, I.F., Shpall, E.J., Anderlini, P., Rondon, G., *et al.* (2011). Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Advances in hematology* 2011, 601953.

Wiesmann, C., Katschke, K.J., Yin, J., Helmy, K.Y., Steffek, M., Fairbrother, W.J., McCallum, S.A., Embuscado, L., DeForge, L., Hass, P.E., *et al.* (2006). Structure of C3b in complex with CRiG gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 444, 217-220.

Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempf, C.D., Sorichter, S., Gerlach, U.V., Juttner, E., *et al.* (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nature medicine* 16, 1434-1438.

Wingard, J.R., Majhail, N.S., Brazauskas, R., Wang, Z., Sobocinski, K.A., Jacobsohn, D., Sorror, M.L., Horowitz, M.M., Bolwell, B., Rizzo, J.D., *et al.* (2011). Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2230-2239.

Wolfram, L., Fischbeck, A., Frey-Wagner, I., Wojtal, K.A., Lang, S., Fried, M., Vavricka, S.R., Hausmann, M., and Rogler, G. (2013). Regulation of the expression of chaperone gp96 in macrophages and dendritic cells. *PloS one* 8, e76350.

Wood, C., Srivastava, P., Bukowski, R., Lacombe, L., Gorelov, A.I., Gorelov, S., Mulders, P., Zielinski, H., Hoos, A., Teofilovici, F., *et al.* (2008). An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet* 372, 145-154.

Wu, J., Wu, Y.Q., Ricklin, D., Janssen, B.J., Lambris, J.D., and Gros, P. (2009). Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nature immunology* 10, 728-733.

Xu, C., Mao, D., Holers, V.M., Palanca, B., Cheng, A.M., and Molina, H. (2000). A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance. *Science* 287, 498-501.

Yang, Y., and Li, Z. (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Molecules and cells* 20, 173-182.

Zaferani, A., Vives, R.R., van der Pol, P., Hakvoort, J.J., Navis, G.J., van Goor, H., Daha, M.R., Lortat-Jacob, H., Seelen, M.A., and van den Born, J. (2011). Identification of tubular heparan sulfate as a docking platform for the alternative complement component properdin in proteinuric renal disease. *The Journal of biological chemistry* 286, 5359-5367.

Zagouri, F., Sergentanis, T.N., Chrysikos, D., Papadimitriou, C.A., Dimopoulos, M.A., and Psaltopoulou, T. (2013). Hsp90 inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Breast* 22, 569-578.

Zeiser, R., Penack, O., Holler, E., and Idzko, M. (2011). Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med (Berl)* 89, 833-845.

Zeng, D., Lewis, D., Dejbakhsh-Jones, S., Lan, F., Garcia-Ojeda, M., Sibley, R., and Strober, S. (1999). Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *The Journal of experimental medicine* 189, 1073-1081.

Zhang, Y., Wu, B.X., Metelli, A., Thaxton, J.E., Hong, F., Rachidi, S., Ansa-Addo, E., Sun, S., Vasu, C., Yang, Y., *et al.* (2015). GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *The Journal of clinical investigation* 125, 859-869.

Zhou, W., Patel, H., Li, K., Peng, Q., Villiers, M.B., and Sacks, S.H. (2006). Macrophages from C3-deficient mice have impaired potency to stimulate alloreactive T cells. *Blood* 107, 2461-2469.

Zhu, X.D., Li, C.L., Lang, Z.W., Gao, G.F., and Tien, P. (2004). Significant correlation between expression level of HSP gp96 and progression of hepatitis B virus induced diseases. *World journal of gastroenterology : WJG* 10, 1141-1145.

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews Immunology* 9, 729-740.

ANNEXE

Quantifying Gp96/Grp94 complexes preparations for vaccines: a key step often inaccurate.

Revue publiée dans le journal *Current Medicinal Chemistry* en 2014.

Quantifying Gp96/Grp94 Complexes Preparations for Vaccines: A Key Step Often Inaccurate

A. Seignez^{1,2,3}, É. Kohli^{1,2}, C. Garrido^{*,1,2,4} and R. Seigneuric^{1,2}

¹Inserm U866: Lipids, Nutrition, Cancer, « Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer », 21000 Dijon, France; ²Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France; ³Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France; ⁴Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France

Abstract: Glycoprotein 96 (Gp96)-peptide complexes are highly investigated for vaccines preparation, particularly in cancer therapy. Gp96, formerly called tumor rejection antigen (TRA)-1, is able to elicit an immune response that can protect mice against tumors, when the mice share the same haplotype than those bearing the tumors from which Gp96 was purified. Secreted Gp96-peptide complexes act as danger signals thereby stimulating the innate immunity regardless of the chaperoned peptides. In contrast, the tumor rejection antigen role of Gp96-peptide complexes is held by the chaperoned peptides in a dose-dependent manner. The purification step is crucial both for insuring the quality and the quantity of Gp96-peptide complexes. To this aim, different methods have been described but they are often suboptimal for the quantification of these complexes. In this review, we discuss a hot topic: the use of the chaperone Gp96 for vaccination purposes in cancer, and also detail the current methods for quantifying Gp96-peptide preparations.

Keywords: Grp94, Gp96, HSP90B1, TRA1, vaccine, lowry assay, bicinchoninic acid assay, bradford assay.

1. INTRODUCTION

Since Edward Jenner's first use of vaccine against smallpox in 1796, vaccines are widely used with more than 70 vaccines against approximately 30 microbes to date. Although they represent the least expensive and most facile way to protect against devastating epidemics, they have yet to realize their full potential (see [1] for a review). Besides anti-infectious vaccination, antitumor vaccination as well as tolerogenic vaccination for auto-immune diseases and transplantation represent important goals of vaccine research. Today, glycoprotein 96 (Gp96)-peptide complexes, that have been revealing their power since almost 30 years [2], are increasingly investigated by research and industry laboratories for antitumor, anti-infectious and tolerogenic vaccination purposes.

Several steps are needed to provide Gp96-peptide complexes of both high quality and quantity (Fig. 1). However, their purification/quantification is far from being standardized and could explain different even paradoxical results obtained. In this review, we will describe the clinical interest of Gp96 and Gp96-peptide complexes for vaccination purposes in cancer, focusing more particularly on the current quantifying methods.

What is Gp96?

Gp96, *alias* glucose-regulated protein 94 (Grp94), heat shock protein (HSP) C4, HSP90B1 or Tra (tumor-rejection antigen)-1 is a chaperone that belongs to the well evolutionary

conserved HSP superfamily [3]. It is the endoplasmic reticulum paralog of the HSP90 family, encoded by the *HSP90B1* gene whose mouse knockouts are embryonic lethal. Like other HSP family members, it is an essential molecular chaperone. Gp96 main function as a molecular chaperone is to direct folding and/or assembly of secreted and membrane proteins. Furthermore, Gp96 has been involved in different cellular functions, in particular cellular differentiation and regulation of apoptosis (see [4] for a review). Besides, Gp96 has a chaperone function for a large variety of peptides, in a transporter associated with antigen-processing (TAP)-dependent or -independent manner [5-8].

Gp96 is synthesized as a precursor of 803 amino-acids in humans (802 in mice), but, after post-translational cleavage of the N-terminal signal peptide, 782 amino-acids remain (781 in mice)[9, 10]. Although Gp96 contains the C-terminal endoplasmic reticulum retention sequence KDEL [11] that justifies its endoplasmic reticulum location, it can also have a transmembrane location and can be secreted. Gp96 has six potential N-glycosylation sites, heterogeneously glycosylated from one protein to another [12, 13]. Gp96 glycans can graft sialic acids [14, 15]. In rat and human prostate cancer cells, an inverse correlation between the cancer aggressiveness and Gp96 glycosylation was shown [16]. It was also found that Gp96 glycans sialylation varied from a cancer type to another [14]. In contrast, membrane Gp96 sialylation was denser in fibrosarcoma cell lines than in normal cells [15]. Knowing that sialylation modifies glycans biochemical behavior and thereby their interactions with extracellular entities (see [17] for a review), it has been hypothesized that interactions between Gp96 and antigen-presenting cells may depend on Gp96 sialylation and/or glycosylation [14, 16]. Gp96 can also be phosphorylated *in vivo* [13, 18], but the

*Address correspondence to this author at the Carmen Garrido, INSERM U866, Faculty of Medicine and Pharmacy, 7 boulevard Jeanne D'Arc, 21079 Dijon, France; Tel: (33) 3 80 39 32 84; Fax: (33) 3 80 39 34 34; E-mail: cgarrido@u-bourgogne.fr

consequences on Gp96 activity remain elusive. (Table 1) presents further biochemical characteristics of mouse and human Gp96 (without any chaperoned peptide). In particular, it includes the amino-acids composition likely to affect the quantification procedure (data from online databases UniProtKB and ExPASy).

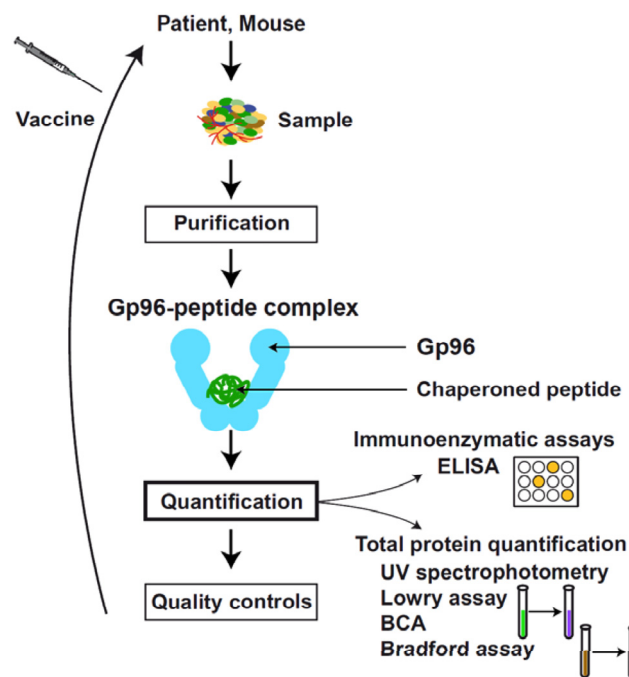


Fig. (1). Cancer cells secrete Gp96 in organs, tissues or in the tumor microenvironment. Gp96-chaperoned peptides act as danger signals stimulating immune responses. Gp96-peptide complexes are purified from mice and patients samples, quantified by immunoenzymatic assays or by total protein quantification methods and checked for quality. Then, the right amount of Gp96-peptide complexes of immunogenic interest may be administrated as a vaccine in a variety of conditions including renal, skin, kidney, pancreatic, brain and lung cancer, autoimmune diabetes or encephalomyelitis.

The binding between Gp96 and the chaperoned peptide involves a hydrophobic pocket of Gp96 [19] that is particularly stable [20]. Gp96 can oligomerize [20-22] by non-covalent protein-protein interactions [12]. In fact, Gp96 is thought to exist almost exclusively as a dimer. This may cooperatively stabilize the active site of each monomer as for other HSP90 members [23-25]. Gp96 is organized into 3 distinct but conserved structural domains: N-terminal (followed by a charged linker domain), middle, and C-terminal (Fig. 2). Targeted inhibitors of HSP90 family proteins such as geldanamycin, radicicol and their derivatives [26] accommodate the nucleotide-binding site of Gp96. The N-terminal domain (Fig. 2) is the site of regulatory ligand binding, and a 5-amino acid insertion (QEDGQ) that is unique to Gp96 forms an additional pocket adjacent to the adenine binding cavity [27]. The endoplasmic reticulum lumen is a major calcium storage compartment. Calcium ions are stored by binding to multiple proteins, Gp96 being one of the major Ca^{2+} binders by its non-conserved charged linker (located between the N-terminal and the middle domains, not shown). The middle domain is a likely site of client protein interactions. Finally, the C-terminal domain provides the homodimerization interface, and contains a potential protein-binding surface that may be used for client or co-chaperone interactions (Fig. 2). Although the precise location of site(s) for binding other proteins or small peptides remains hypothetical, Gp96 is known to be a cargo for them.

Why Gp96-peptide Complexes Might be Used as a Vaccine?

Gp96 secretion is induced by different types of stress [28]. These secreted Gp96-peptide complexes are capable of binding to the membrane of antigen-presenting cells, for instance through the CD91 receptor [29-32], leading to their endocytosis [33] and, *in fine*, to peptide expression in the context of class II major histocompatibility complex molecules, recognizable by CD4 T lymphocytes [34-36], or of class I major histocompatibility complex molecules, recognized by T CD8 lymphocytes [37].

Table 1. Comparison of Biochemical Characteristics of Mouse Gp96 and Human Gp96 (Without Chaperoned Peptides)

Biochemical Characteristics Involved in the Quantification Methods	Mouse Gp96	Human Gp96
Similarity (in %)	96,5	
Length after cleavage of signal peptide and of propeptide (in number of amino-acids)	781	782
Molecular weight (in kDa)	94	94
Theoretical isoelectric point (pI)	4.72	4.73
Number of potential N-glycosylation sites	6	6
Tryptophan (in %)	1.0	1.0
Tyrosine (in %)	3.1	3.1
Phenylalanine (in %)	3.8	3.8
Cystine (in %)	0.4	0.4
Extinction coefficient at 280 nm, with bound cystines (in $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	79885	79885

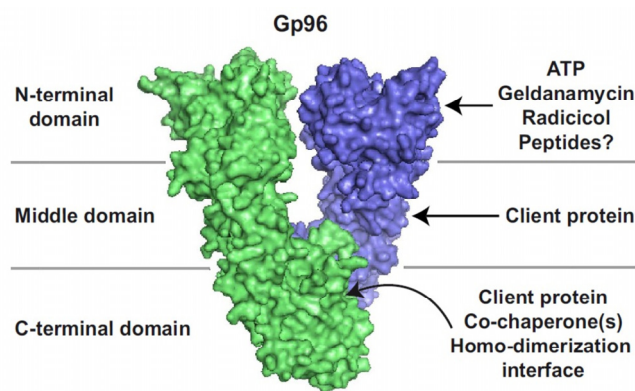


Fig. (2). Structural domains of Gp96: as a HSP90 chaperone, Gp96 is a homodimer organized into 3 major distinct structural domains: the N-terminal (N), middle (M), and C-terminal (C) domains. The near-full length structure of canine Gp96 (98.5 % identical to human Gp96 [91]) was experimentally determined in complex with a bound nucleotide, PDB entry 2O1V. A stereo surface view of the 2 protomers is represented in green and blue with PyMol. Indicated are the sites for ATP, Geldanamycin, Radicicol, client proteins and co-chaperones binding.

Gp96, formerly called tumor rejection antigen (TRA)-1, like other high molecular weight HSPs, has been shown to elicit an immune response (involving both the innate and adaptive pathways) able to protect mice against tumors, when the mice share the same haplotype than those bearing the tumors from which the Gp96 was purified [2]. Secreted Gp96-peptide complexes act as danger signals thereby stimulating the innate immunity regardless of the chaperoned peptides [38, 39]. In contrast, the tumor rejection antigen role of Gp96-peptide complexes is held by chaperoned peptides [40, 41]. Therefore, Gp96-peptide complexes have been much studied for their antitumor properties, mainly in the perspective of a cancer immunotherapy, with encouraging results (see [42-44] for reviews). To date, there is no Gp96-peptide as a commercial drug, but, for instance, the vitespen vaccine (ONCOPHAGE[®], developed by Antigenics) consisting in an autologous Gp96-peptide complexes preparation extracted from the patient's tumor, has proved its efficacy in many tumor types [45]. Vitespen has been studied in many clinical trials (see Table 2); notably, it is currently in phase II clinical trial in glioma [46], and was tested in phase III clinical trials in melanoma [47] and renal cell carcinoma [48]. To prepare this therapeutic vaccine, Gp96 is purified from the patient's excised tumor extract; then Gp96-peptide complexes preparation is quantified and controlled before being administered to the patient [49, 50].

Srivastava's team was the first to highlight the dose-dependent nature of the properties of Gp96-peptide complexes in mice: in one hand, subcutaneous administration of 10 μ g, but not 100 μ g, of Gp96-tumoral peptide complexes exerted a preventive action against sarcoma [51]; on the other hand, subcutaneous administration of 100 μ g, but not 10 μ g, of Gp96-self peptide exerted a preventive action against autoimmune diabetes and experimental autoimmune encephalomyelitis [52]. This discovery of tolerogenic properties of high doses of Gp96-peptide complexes led teams to challenge a high dose of Gp96-nonself peptide complexes in skin graft [53] and heart transplantation [54]: a significant

delay of graft rejection was observed in both studies. Other reports reinforce the evidence that Gp96 plays a key role in autoimmunity [55] and, for instance, that a high dose could be administrated as a vaccine in liver immune hyper-activation [56].

On the basis of their immunogenic properties, Gp96-peptide complexes may be used successfully not only in anticancer vaccination but also in anti-infectious vaccination [57-60].

Thus, the immuno-modulatory properties of Gp96-peptide complexes seem to be associated to the chaperoned peptides (tumor peptides in cancer, self peptides in autoimmunity, non-self peptides in graft rejection and pathogen antigens in infection). In recombinant Gp96 commercial solutions, Gp96 probably does not harbor peptides, or carries peptides without immunogenic interest. Accordingly, the most employed method to obtain Gp96-peptide complexes is purification from organs and tissues [61-63]. Quantification of the preparation at the end of purification is a critical step that allows determining the Gp96-peptide complexes concentration and therefore enables to adjust it accordingly.

2. WHICH QUANTIFICATION METHODS ARE AVAILABLE AND WHICH CRITERIA TO USE TO DISCRIMINATE THEM?

Gp96-peptide complexes in a purified solution can be quantified specifically by immunoenzymatic assays or through the quantification of total proteins by ultraviolet spectrophotometry, the Lowry, bicinchoninic acid (BCA) or Bradford assays.

Many criteria must be examined to select the most appropriate quantification method [64] for Gp96. First of all is the specificity of the quantification. If the sample to quantify is pure or mostly contains Gp96, as can be obtained after purification from organs and tissues [61-63], a method that quantifies proteins without discrimination will be suitable.

Secondly, when the range of Gp96 concentration in the sample is unknown, it is important for the quantification method to exhibit a linear response over a large range of concentrations.

Third, it is also important that the method gives consistent results from a protein to another and from an experiment to another. This is the reliability.

Four, the assay must be sensitive to quantify even low concentrations.

Five, since the sample to quantify may be precious, especially if it has been obtained after a long purification process, we will favor a non-destructive quantification technique, or otherwise a technique requiring a small sample volume.

Finally, we will also consider the cost, runtime and simplicity of the method.

3. SPECIFIC QUANTIFICATION METHOD: THE IMMUNOENZYMATIC ASSAY

Principle

There are ELISA kits for quantification of Gp96 that use a monoclonal coating antibody and a polyclonal detection

Table 2. Examples of Recorded Clinical Trials (From ClinicalTrials.gov, Last Access August 2013) Evaluating the Use of Gp96-Peptide Complexes in Cancer

Study Starting Date	Source of Gp96	Condition	Clinical Trial Type	Identifier
March 1997	HSPPC-96	Pancreatic Cancer	Phase I, One-center, Non-Randomized	NCT00003025
November 1999	HSPPC-96	Sarcoma	Phase II, One-center, Non-Randomized	NCT00005628
March 2000	HSPPC-96	Lymphoma	Phase II, One-center, Non-Randomized	NCT00081809
June 2000	HSPPC-96	Renal Cell Carcinoma	Phase III, Multicenter, Randomized	NCT00033904
March 2002	HSPPC-96	Malignant Melanoma	Phase III, Multicenter, Randomized	NCT00039000
July 2002	HSPPC-96	Renal Cell Carcinoma	Phase II, One-center, Randomized	NCT00082459
September 2003	HSPPC-96	Non-Small Cell Lung Cancer	Phase II, One-center, Non-Randomized	NCT00098085
May 2005	HSPPC-96	Renal Cell Carcinoma	Phase III, Multicenter, Randomized	NCT00126178
October 2005	HSPPC-96	Brain and Central Nervous System Tumors	Phase I/II, Multicenter, Non-Randomized	NCT00293423
May 2007	Gp96-Ig	Non-Small Cell Lung Cancer	Phase I, One-center, Non-Randomized	NCT00503568
June 2009	HSPPC-96	Brain and Central Nervous System Tumors	Phase II, Multicenter, Non-Randomized	NCT00905060
January 2010	HSPPC-96	Renal Cell Carcinoma	Phase II, Multicenter, Randomized,	NCT01147536
April 2013	Gp96-Ig	Non-Small Cell Lung Cancer	Phase I, One-center, Randomized	NCT01799161
May 2013	HSPPC-96	Glioblastoma	Phase II, Multicenter Randomized	NCT01814813

HSPPC-96: Heat Shock Protein-Peptide Complex 96 (i.e.: Gp96-peptide complex) purified from the patient's excised tumor. Gp96-Ig is a fusion protein lacking the KDEL C-terminal sequence, intrinsically secreted by cancer cells and capable of inducing an immunological response similar to that of Gp96-peptide complexes (see Strbo & Podack, 2008 for a review).

antibody in a sandwich setup (EIAab[®], CUSABIO[®]). Signal, measured at 450 nm, arises from the production of a colored substance (tetramethylbenzidine) by action of horseradish peroxidase, an enzyme bound to the detection antibody via the avidin-biotin system. Recombinant Gp96 is used as the standard.

Advantages

The immunoenzymatic assay is highly specific and sensitive. Concentration ranges from about 0.15 to 10 ng.mL⁻¹. Due to its strong sensitivity, samples to be quantified can be diluted.

Disadvantage

It is expensive and time consuming. Moreover, affinity of coating and detection antibodies for recombinant Gp96 (the standard) and Gp96-peptide complexes (the sample, most of time) could differ, which would introduce an unpredictable bias in the quantification.

Commentary

Due to its high specificity, the immunoenzymatic assay should be preferred for Gp96 quantification in the case of an unpurified sample.

4. TOTAL PROTEINS QUANTIFICATION METHODS

The methods presented below are based on the measurement, at a given wavelength, of the absorbance of the sample to quantify proteins that have reacted, directly or indirectly, with a colouring substance (except for ultraviolet spectrophotometry). Absorbance is proportional to the proteins concentration, generally from blank to 1 absorbance unit. So, we can measure protein concentration of a sample by measuring its absorbance, knowing its extinction coefficient. However, relying on a theoretical extinction coefficient for Gp96 may be tricky. Indeed, this coefficient does not take into account: the variability from an experiment to another, potential interferences due to glycans, the potential Gp96 oligomerization or the presence of chaperoned peptides for instance. Thus, the best choice for Gp96 is to prepare a standard range with a standard protein that has been carefully chosen, as it will be discussed below. Although they should ideally be aligned, the data points may exhibit a slight concavity towards the x-axis.

Each quantification method can be biased by interfering substances. A recommendation to eliminate/reduce interferences due to non-protein interactions (nucleic acids, lipids,...) is to add trichloroacetic acid in the sample to precipitate proteins in order to remove the supernatant contami-

nants, and then to re-dissolve the protein pellet in an alkaline or neutral solvent [65]. Trichloroacetic acid can alternatively be replaced by acetone. However, the procedure can result in a net decrease of protein concentration. Moreover, for Gp96-peptide complexes quantification, interferences may remain for instance because glycans also contribute to the absorbance.

All the methods discussed below are suitable for spectrophotometry measurements in test tubes or well plates.

4a. Ultraviolet Spectrophotometry

Principle

To measure absorbance of a sample in the ultraviolet spectrum, without any reagents. Proteins, by their aromatic amino-acids (tryptophan, tyrosine and, to a lesser extent, phenylalanine), absorb at 280 nm in an acidic or neutral solvent.

Advantages

It is a rapid and convenient method. The required sample volume varies according to the different spectrophotometers (e.g. only 1 μ l is needed with a NanoDrop spectrophotometer). Some spectrophotometers enable the recovery of the sample after its quantification (although if it has been thawed, bacterial contamination and protein integrity may be an issue).

Disadvantage

The greatest drawback of this method is its lack of specificity: if the sample is not completely pure, interferences may hinder the measure at 280 nm. For instance, nucleic acids absorb at 260 nm: absorbance at 280 nm of a solution containing nucleic acids may be overestimated.

4b. The Lowry Assay

Principle

To measure absorbance at 750 nm (or 690 nm) of a protein sample after reaction [66]. In an alkaline milieu, cupric ions (Cu^{2+}) are reduced in cuprous ions (Cu^+) by tryptophan, tyrosine, cysteine and peptidic bounds of proteins [67]: that is called biuret reaction. Then Folin-Ciocalteu reagent (sodium tungstate and sodium molybdate) reduces tryptophan and tyrosine of proteins, and forms a colored complex. Lowry assay was object of numerous adjustments. Modifications of this method have been included in order to simplify it and increase its sensitivity [68, 69], increase the number of molecules able to be quantified [70-72] and to lessen the interfering substances [73-75].

Advantage

In biochemistry, the Lowry assay is a reference.

Disadvantage

The Lowry assay requires 40 μ l of sample which is quite a large volume. Furthermore, substances that react with copper influence the absorbance of the sample. To overcome this problem, the concentration of cupric ions in the chemical system must be doubled or tripled. Other biological mole-

cules can also interfere, such as glycans or detergents [76, 77]. Finally, a bias can result from a difference between the percentage of tryptophan and tyrosine in the amino-acid composition of the sample with respect to the protein used as a control.

4c. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay

Principle

It can be considered as a modification of the Lowry assay. After reduction in an alkaline milieu of cupric ions (Cu^{2+}) in cuprous ions (Cu^+) by proteins (biuret reaction), BCA forms a colored complex with cuprous ions, which absorbance is measured at 562 nm [78].

Advantages

It is more linear, stable, and a little less prompt to interferences (especially by detergents) than the Lowry assay. Smaller volume samples are needed (10- 25 μ l).

Disadvantages

It is more influenced than the Lowry assay by the quantification conditions (e.g. temperature, reaction runtime). Furthermore, tryptophan, tyrosine and cysteine interfere in this quantification method as they form a colored product with BCA [67]. Glycans can also interfere because of their reducing properties [76, 77]. As for the Lowry assay, increasing the amount of cupric ions can limit this interference. The use of a glycoprotein as a standard can also reduce this problem.

Comments

For an accurate measurement, proteins must not be in excess compared with cupric ions [76]. Absorbance measurement might be performed after incubation at 37°C during 30 min, but, as color increases gradually during at least 2 h, the longer the time of incubation, the better the sensitivity. It is possible to incubate the system at 60°C during 30 min to accelerate development of the color. The standard range of the BCA assay is typically from 20 to 2000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. A lower range, from 0.5 to 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, is theoretically reachable by the "microBCA" test that requires larger sample volumes.

4d. The Bradford Assay

Principle

The Bradford assay, also named Coomassie dye binding assay, partially relies on electrostatic binding between protein cations and sulfonyl groups of Coomassie blue. The reagent containing Coomassie blue is acidic enough to ensure cationic forms of sample proteins. Colored signal is measured between 570 and 610 nm, ideally at 595 nm. The method has been calibrated and validated for all globular proteins [79]. A modified method make the quantification of collagens possible [80], but other fibrous proteins are known to bind to Coomassie blue. Gp96-peptide complexes, as globular proteins, may be quantified with this assay.

Advantages

The Bradford assay is simpler and faster than the Lowry assay. It can handle reducing agents; the only interfering

substances being basic detergents. Moreover, this method needs only 10 μ l of sample.

Disadvantages

Quantification by the Bradford assay is more likely to be biased by biochemical discrepancies between standard range protein and sample protein. For instance, the concentration of any globular protein in a sample could be under-estimated if bovine or human serum albumin is used as a standard because of the high affinity of Coomassie blue for albumin [76, 81]. Finally, in contrast to the Lowry and BCA assays, the Bradford assay underestimates glycoprotein concentrations [77].

Comments

A Bradford “plus” assay has been developed to decrease the protein-to-protein variation and improve linearity of the method. This is the test we will mention as the “Bradford assay” thereafter. Moreover, to increase sensitivity, an “enhanced protocol” suggests using much more sample, but this reduces the working range and may increase potential interfering entities.

4e. Which Protein(s) to Choose As Standard for Gp96-peptide Complexes Quantification?

For an accurate quantification, it is essential to choose a standard protein that is biochemically similar to the Gp96. A good standard protein must also be safe, cheap and not stored in a complex solution containing a lot of molecules that could potentially interfere with the selected quantification method.

We have analyzed several proteins biochemically similar to Gp96. Ovotransferrin (also named conalbumin) seemed to us a good choice according to the online database UniProtKB (Table 3). In pilot experiments, we compared recombinant Gp96, ovotransferrin and bovine serum albumin – ordinarily used as a standard range [82]. Experimental results were dramatically different from expectations as ovotransferrin and bovine serum albumin absorbance were quite different from that of recombinant Gp96 (unpublished observations).

Data presented in (Table 3) come from the online database UniProtKB, products datasheets and personal communications. Recombinant Gp96 (Enzo Life Sciences®) comes from canine Gp96 and is produced in Sf21 cells. It is 96.4 % similar to mouse Gp96 (ExPASy). Other companies like Abnova produce a human recombinant Gp96 for instance. Recombinant Gp96 is mainly used for immunoprints and immunoenzymatic assays. Although recombinant Gp96 contains some contaminants (as mentioned in the product datasheet) and is quite expensive, it seems to be the most appropriate standard protein for quantification of Gp96-peptide complexes.

5. SUGGESTION OF A GP96-PEPTIDE COMPLEXES QUANTIFICATION PROTOCOL

We searched Pubmed for Gp96 quantification assays with Gp96-containing solutions (in published reports from 2007 to April 2013). Given the limited access to the scien-

tific literature, we could only analyze 27 reports (out of 39 hits) from different teams. The data, summarized in (Fig. 3), indicates that in most cases, the quantification assay was not specified (16 reports). When specified, most quantification methods rely on the Bradford assay (5 reports); then, on the BCA assay (3 reports); spectrophotometry at 280 nm (2 reports) and the immunoenzymatic assay (1 report). The proportion of unspecified quantification method (59 %) is quite high and indicates how often this step is neglected.

Quantification assays for Gp96-peptide complexes

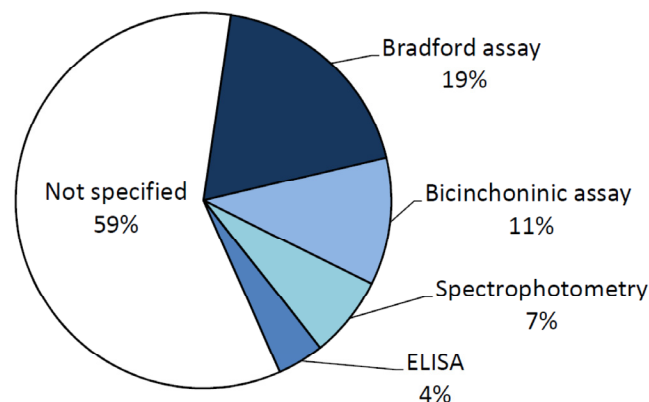


Fig. (3). Percentages of used Gp96-peptide complexes-quantification assays from studies within the last 5 years. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

(Table 4) summarizes the quantification assays characteristics analyzed in this review. Each criterion, addressed above, is graded from 0 to 3 (from bad to excellent) and weighted according to our expected importance.

In case of quantification of Gp96-peptide complexes in a solution without – or very few – contaminant proteins, like a purified preparation, we suggest to perform the BCA assay (Table 4). Finding an ideal standard protein is currently a major problem. As biochemical similarity between Gp96-peptide complexes and a standard protein is crucial, we recommend recombinant Gp96 (Table 3) despite its price and contaminants (EDTA, MOPS and concanavalin A). First, in recombinant Gp96 from commercial preparations, EDTA is at 0.5 mM and MOPS at 20 mM; provided these concentrations remain below respectively 10 and 100 mM, interferences with the BCA quantification assay are negligible (for more information see <http://www.piercenet.com>). Second, concanavalin A, a sugar-affine molecule, was detected in recombinant Gp96 industrial preparations by immunoprint in our laboratory (unpublished data). This may due to its use in affinity chromatography as a static phase during recombinant Gp96 purification; so concanavalin A would be present but only at low concentrations. Finally, for cost-effectiveness, we suggest to use only 5 μ l of recombinant Gp96 preparation at 1 mg.ml⁻¹ (less than 20 € or 25 US\$).

Detergent action on Gp96-peptide complexes may be relevant, as it may disaggregate complexes (if highly concentrated, Gp96 might also dissociate from its chaperoned peptides). According to the Pierce's datasheet (<http://www.piercenet.com>), triton® X-100 at 5.0 %, Tween®-80 at 5.0 % or sodium dodecylsulfate at 5.0 % can be used with the BCA assay (whereas ultraviolet spectrophotometry,

Table 3. Comparison of Biochemical Characteristics Between “Naturally” Produced Mouse Gp96, Recombinant Canine Gp96, Bovine Serum Albumin and Ovotransferrin

Biochemical Characteristics Involved in Quantification Methods	Mouse Gp96	Bovine Serum Albumin	Recombinant Canine Gp96	Ovotransferrin
Length after cleavage of signal peptide and propeptide if appropriate (in number of amino-acids)	781	583	783	686
Molecular weight (in kDa)	94	66	94	76
Theoretical isoelectric point pI	4.72	5.60	4.75	6.69
Number of potential N-glycosylation sites	6	0	6	1
Tryptophan (in %)	1.0	0.3	1.0	1.5
Tyrosine (in %)	3.1	3.4	3.1	3.1
Phenylalanine (in %)	3.8	4.6	3.8	3.8
Cystine (in %)	0.4	6.0	0.4	4.4
Extinction coefficient at 280 nm, with bound cystines (in M ⁻¹ .cm ⁻¹)	79885	42925	79760	86290
Comments	Forms Gp96-peptide complexes. Oligomerizes. Binding sites for ATP	Potential binding sites for zinc and copper	Oligomerizes. Binding sites for ATP	Binding sites for iron
Safety pictograms	Homemade	Not harmful	Irritant	Harmful
Impurities	Homemade	Pure at more than 96 %	Concanavalin A, MOPS 20 mM EDTA 0,5 mM	No iron
Relative cost	Homemade	1	≈ 600 000	≈ 70
Conservation	(At – 80 °C)	At – 20 °C	At – 20 °C	At – 20 °C

As indicated in Table 1, human Gp96 is almost identical to mouse Gp96. Relative costs come from Enzo Life Sciences® and Sigma-Aldrich®. The presence of concanavalin A in recombinant Gp96 solution was determined in our laboratory (unpublished observations). EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid; MOPS: 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid.

Table 4. Evaluation of the Quantification Assays According to the Indicated 8 Criteria

Item	Grade	ELISA	SP at 280	NanoDrop	Lowry Assay	BCA assay	MicroBCA	Bradford Assay	Bradford Assay +
Reliability	4	*	0	0	1	2	2	1	1
Specificity	3	3	0	0	1	1	1	1	1
Range	3	3	2	2	3	3	1	2	1
Sensitivity	2	3	2	2	1	1	2	1	2
Limited sample consumption	2	2	1	3	1	1	0	2	0
Cost	2	0	3	3	2	2	2	2	2
Throughput	1	0	2	2	2	1	1	2	2
Ease-of-use	1	0	3	2	2	1	1	2	2
Total		28 + *	23	26	28	30	24	27	22

Grades were determined according to our expectation for Gp96-peptide complexes quantification. *The reliability of immunoenzymatic assay is difficult to grade because of a potential affinity difference between recombinant Gp96 (standard) and Gp96-peptide complexes. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; UK: unknown; SP: spectrophotometry.

the Lowry and the Bradford assays may be sensitive even to low concentrations of detergents). BOX 1 explains our suggested protocol (a detailed example can be provided on request).

BOX 1: SUGGESTED PROTOCOL

1. Aliquote a Gp96-peptide complexes preparation. Dilute and/or concentrate it several times to obtain several duplicated samples of 25 μl within the BCA assay working range: the hue of the corresponding samples should lay between transparent (blank) and deep purple. Use a flat bottom 96-wells plate suited for measures at 562 nm.
2. a. Prepare 25 μl of duplicated recombinant Gp96 at 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.
2. b. At this step, a small dose of detergent in wells may be added (for example 4 % of sodium dodecylsulfate). To do so, do not load 25 μl but, for instance, 12.5 μl of sample in each point, and add 12.5 μl of a detergent preparation; mix.
3. Prepare extemporaneously the BCA assay working reagent, following a 50:2 ratio for reagent A and reagent B respectively. Add 200 μl of working reagent in each well. Mix about 30 s and incubate at 37 °C during at least 30 min (at least 1 h is recommended).
4. Measure samples absorbance at 562 nm. Plot the data points (dilution/concentration factor in x, absorbance in y) and draw a curve. Deduce from 100 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$ recombinant Gp96 absorbance its theoretical dilution/concentration factor for the preparation. Finally, deduce the dilution or concentration to perform to obtain a preparation at the targeted concentration.

6. CONCLUDING REMARKS

Even after a careful purification, a Gp96-peptide complexes preparation cannot be totally pure. Based on mass spectrometry after 2-dimensional gel electrophoresis, Fairburn and colleagues found that Gp96 represented 73.1 % of total purified proteins [83]. In fact, other proteins sharing biochemical characteristics are purified with Gp96 such as calreticulin (5.8 %) for instance [83]. This major limitation has to be kept in mind when dealing with Gp96-peptide complexes.

Each quantification method has obviously advantages and drawbacks, and one has to choose the most appropriate method (i.e. assay, standard and protocol). After an unbiased critical review of all the methods reported for Gp96-peptide complexes quantification, we suggest using the BCA assay with recombinant Gp96 as standard (BOX 1). Since all quantification assays suffer from interferences, a main point is to limit and control interferences that hinder a precise quantification. Recombinant Gp96, which characteristics are very close to the “natural” Gp96, was chosen as a standard protein to limit the “structure” interference. Reported methods to reduce “environment” interferences, by protein precipitation either with trichloroacetic acid or acetone treatment, are not included in our proposed protocol because they may introduce more biases than they reduce. Moreover, non-protein “environment” interferences might be rather weak in a puri-

fied preparation. Finally, as Gp96 can chaperone a large variety of peptides, it is not possible, knowing for example their amino-acidic sequences, to predict their impact on the quantification procedure. However, given that these peptides are generally short [6] – they are for instance antigenic peptides of about ten amino-acids – their impact is thought to be limited. The chaperone’s client proteins, in contrast to promiscuously bound peptides, are not purified with Gp96 [84].

The importance of a reliable quantification assay is obvious. In pharmacology, included vaccinology, it is known from centuries that all drugs are effective only within a small interval of concentrations [85]. In particular, the relevance of having an accurate Gp96-peptide complexes quantification method when performing immunizing protocols has been underlined by Chandawarkar *et al.* [51, 52], where a totally opposite effect is obtained from 10 and 100 μg of purified preparation. This is also true for other molecules. For instance, it has recently been reported that ATP, that plays a main role in the physiopathology of immunologic diseases [86-89], exerted a totally opposite action on T CD4 cells if concentrated at 250 nM or at 1 mM [90]. Altogether, these results imply that many other molecules might exert this type of dose-response effect, and reinforce the idea that the quantification method is a crucial step of research when performing immunizing assays.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Fabrice Neiers for helpful discussions. This work financially was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” (LabEx ANR-11-LABX-0021), the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue Nationale Contre le Cancer (“Label of Excellence”), Région Bourgogne, INSERM, CHU de Dijon and by the EU 7th framework program « European IPF Network » (SPEDOC 248835).

ABBREVIATIONS

BCA	=	Bicinchoninic acid assay
EDTA	=	Ethylene diamine tetra acetic acid
Gp96	=	Glycoprotein 96
Grp94	=	Glucose-regulated protein 94
HSP	=	Heat shock protein
MOPS	=	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid

REFERENCES

- [1] Nabel, G. J. Designing tomorrow's vaccines. *N. Engl. J. Med.*, **2013**, 368(6), 551-560.
- [2] Srivastava, P. K.; DeLeo, A. B.; Old, L. J. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83(10), 3407-3411.
- [3] Kampinga, H. H.; Hageman, J.; Vos, M. J.; Kubota, H.; Tanguay, R. M.; Bruford, E. A.; Cheetham, M. E.; Chen, B.; Hightower, L.

- E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, **2009**, 14(1), 105-111.
- [4] Lanneau, D.; Wettstein, G.; Bonniaud, P.; Garrido, C. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorld-Journal*, **2010**, 10, 1543-1552.
 - [5] Menoret, A.; Peng, P.; Srivastava, P. K. Association of peptides with heat shock protein gp96 occurs *in vivo* and not after cell lysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 262(3), 813-818.
 - [6] Spee, P.; Neefjes, J. TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur. J. Immunol.*, **1997**, 27(9), 2441-2449.
 - [7] Arnold, D.; Wahl, C.; Faath, S.; Rammensee, H. G.; Schild, H. Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96. *J. Exp. Med.*, **1997**, 186(3), 461-466.
 - [8] Lammert, E.; Arnold, D.; Nijenhuis, M.; Momburg, F.; Hammerling, G. J.; Brunner, J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G.; Schild, H. The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur. J. Immunol.*, **1997**, 27(4), 923-927.
 - [9] Mazzarella, R. A.; Green, M. ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP94). *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262(18), 8875-8883.
 - [10] Gevaert, K.; Goethals, M.; Martens, L.; Van Damme, J.; Staes, A.; Thomas, G. R.; Vandekerckhove, J. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21(5), 566-569.
 - [11] Ferro, S.; Pelham, H. R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **1987**, 48(5), 899-907.
 - [12] Wearsch, P. A.; Nicchitta, C. V. Purification and partial molecular characterization of GRP94, an ER resident chaperone. *Protein Expr. Purif.*, **1996**, 7(1), 114-121.
 - [13] Cala, S. E. GRP94 hyperglycosylation and phosphorylation in Sf21 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1496(2-3), 296-310.
 - [14] Suriano, R.; Ghosh, S. K.; Chaudhuri, D.; Mittelman, A.; Banerjee, A.; Tiwari, R. K. Sialic acid content of tissue-specific gp96 and its potential role in modulating gp96-macrophage interactions. *Glycobiology*, **2009**, 19(12), 1427-1435.
 - [15] Avidan, A.; Perlmuter, M.; Tal, S.; Oraki, O.; Kapp, T.; Krelm, Y.; Elkabets, M.; Dotan, S.; Apte, R. N.; Lichtenstein, R. G. Differences in the sialylation patterns of membrane stress proteins in chemical carcinogen-induced tumors developed in BALB/c and IL-1alpha deficient mice. *Glycoconj. J.*, **2009**, 26(9), 1181-1195.
 - [16] Suriano, R.; Ghosh, S. K.; Ashok, B. T.; Mittelman, A.; Chen, Y.; Banerjee, A.; Tiwari, R. K. Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention. *Cancer Res.*, **2005**, 65(14), 6466-6475.
 - [17] Varki, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, **2007**, 446(7139), 1023-1029.
 - [18] Miyata, Y.; Yoneda, Y.; Yahara, I. Stimulation of CK2-dependent Grp94 phosphorylation by the nuclear localization signal peptide. *Mol. Cell Biochem.*, **2011**, 356(1-2), 191-200.
 - [19] Sastry, S.; Linderth, N. Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(17), 12023-12035.
 - [20] Linderth, N. A.; Popowicz, A.; Sastry, S. Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(8), 5472-5477.
 - [21] Lee, A. S.; Bell, J.; Ting, J. Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259(7), 4616-4621.
 - [22] Wearsch, P. A.; Nicchitta, C. V. Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry*, **1996**, 35(51), 16760-16769.
 - [23] Cunningham, C. N.; Krukenberg, K. A.; Agard, D. A. Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(30), 21170-21178.
 - [24] Harris, S. F.; Shiao, A. K.; Agard, D. A. The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure*, **2004**, 12(6), 1087-1097.
 - [25] Nemoto, T.; Ohara-Nemoto, Y.; Ota, M.; Takagi, T.; Yokoyama, K. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 233(1), 1-8.
 - [26] Jego, G.; Hazoume, A.; Seignuric, R.; Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.*, **2010**, 332(2), 275-285.
 - [27] Dollins, D. E.; Immormino, R. M.; Gewirth, D. T. Structure of unliganded GRP94, the endoplasmic reticulum Hsp90. Basis for nucleotide-induced conformational change. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280(34), 30438-30447.
 - [28] Altmeyer, A.; Maki, R. G.; Feldweg, A. M.; Heike, M.; Protopopov, V. P.; Masur, S. K.; Srivastava, P. K. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int. J. Cancer*, **1996**, 69(4), 340-349.
 - [29] Binder, R. J.; Han, D. K.; Srivastava, P. K. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.*, **2000**, 1(2), 151-155.
 - [30] Banerjee, P. P.; Vinay, D. S.; Mathew, A.; Raju, M.; Parekh, V.; Prasad, D. V.; Kumar, A.; Mitra, D.; Mishra, G. C. Evidence that glycoprotein 96 (B2), a stress protein, functions as a Th2-specific costimulatory molecule. *J. Immunol.*, **2002**, 169(7), 3507-3518.
 - [31] Jockheck-Clark, A. R.; Bowers, E. V.; Totonchy, M. B.; Neubauer, J.; Pizzo, S. V.; Nicchitta, C. V. Re-examination of CD91 function in GRP94 (glycoprotein 96) surface binding, uptake, and peptide cross-presentation. *J. Immunol.*, **2010**, 185(11), 6819-6830.
 - [32] Pawaria, S.; Binder, R. J. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat. Commun.*, **2011**, 2, 521.
 - [33] Singh-Jasuja, H.; Toes, R. E.; Spee, P.; Munz, C.; Hilf, N.; Schoenberger, S. P.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Neefjes, J.; Rammensee, H. G.; Arnold-Schild, D.; Schild, H. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.*, **2000**, 191(11), 1965-1974.
 - [34] Matsutake, T.; Sawamura, T.; Srivastava, P. K. High efficiency CD91- and LOX-1-mediated re-presentation of gp96-chaperoned peptides by MHC II molecules. *Cancer Immun.*, **2010**, 10, 7.
 - [35] SenGupta, D.; Norris, P. J.; Suscovich, T. J.; Hassan-Zahraee, M.; Moffett, H. F.; Trocha, A.; Draenert, R.; Goulder, P. J.; Binder, R. J.; Levey, D. L.; Walker, B. D.; Srivastava, P. K.; Brander, C. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J. Immunol.*, **2004**, 173(3), 1987-1993.
 - [36] Doody, A. D.; Kovalchin, J. T.; Mihalyo, M. A.; Hagymasi, A. T.; Drake, C. G.; Adler, A. J. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for *in vivo* presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J. Immunol.*, **2004**, 172(10), 6087-6092.
 - [37] Suto, R.; Srivastava, P. K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*, **1995**, 269(5230), 1585-1588.
 - [38] Singh-Jasuja, H.; Scherer, H. U.; Hilf, N.; Arnold-Schild, D.; Rammensee, H. G.; Toes, R. E.; Schild, H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.*, **2000**, 30(8), 2211-2215.
 - [39] Basu, S.; Binder, R. J.; Suto, R.; Anderson, K. M.; Srivastava, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.*, **2000**, 12(11), 1539-1546.
 - [40] Udono, H.; Srivastava, P. K. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J. Immunol.*, **1994**, 152(11), 5398-5403.
 - [41] Binder, R. J.; Srivastava, P. K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat. Immunol.*, **2005**, 6(6), 593-599.
 - [42] Podack, E. R.; Racz, L. E. Allogeneic tumor-cell-based vaccines secreting endoplasmic reticulum chaperone gp96. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2007**, 7(11), 1679-1688.
 - [43] Amato, R. J. Heat-shock protein-peptide complex-96 for the treatment of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2007**, 7(8), 1267-1273.
 - [44] Randazzo, M.; Terness, P.; Opelz, G.; Kleist, C. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *Int. J. Cancer*, **2012**, 130(10), 2219-2231.
 - [45] di Pietro, A.; Tosti, G.; Ferrucci, P. F.; Testori, A. Oncophage: step to the future for vaccine therapy in melanoma. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2008**, 8(12), 1973-1984.

- [46] Crane, C. A.; Han, S. J.; Ahn, B.; Oehlke, J.; Kivett, V.; Fedoroff, A.; Butowski, N.; Chang, S. M.; Clarke, J.; Berger, M. S.; McDermott, M. W.; Prados, M. D.; Parsa, A. T., Individual patient-specific immunity against high-grade glioma after vaccination with autologous tumor derived peptides bound to the 96 KD chaperone protein. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, (1), 205-14.
- [47] Testori, A.; Richards, J.; Whitman, E.; Mann, G. B.; Lutzky, J.; Camacho, L.; Parmiani, G.; Tosti, G.; Kirkwood, J. M.; Hoos, A.; Yuh, L.; Gupta, R.; Srivastava, P. K. Phase III comparison of vitespen, an autologous tumor-derived heat shock protein gp96 peptide complex vaccine, with physician's choice of treatment for stage IV melanoma: the C-100-21 Study Group. *J. Clin. Oncol.*, **2008**, *26*(6), 955-962.
- [48] Wood, C.; Srivastava, P.; Bukowski, R.; Lacombe, L.; Gorelov, A. I.; Gorelov, S.; Mulders, P.; Zielinski, H.; Hoos, A.; Teofilovici, F.; Isakov, L.; Flanagan, R.; Figlin, R.; Gupta, R.; Escudier, B. An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet*, **2008**, *372*(9633), 145-154.
- [49] Gordon, N. F.; Clark, B. L. The challenges of bringing autologous HSP-based vaccines to commercial reality. *Methods*, **2004**, *32*(1), 63-69.
- [50] Srivastava, P. K.; Callahan, M. K.; Mauri, M. M. Treating human cancers with heat shock protein-peptide complexes: the road ahead. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2009**, *9*(2), 179-186.
- [51] Chandawarkar, R. Y.; Wagh, M. S.; Srivastava, P. K. The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations. *J. Exp. Med.*, **1999**, *189*(9), 1437-1442.
- [52] Chandawarkar, R. Y.; Wagh, M. S.; Kovalchin, J. T.; Srivastava, P. Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. *Int. Immunol.*, **2004**, *16*(4), 615-624.
- [53] Kovalchin, J. T.; Mendonca, C.; Wagh, M. S.; Wang, R.; Chandawarkar, R. Y. *In vivo* treatment of mice with heat shock protein, gp 96, improves survival of skin grafts with minor and major antigenic disparity. *Transpl. Immunol.*, **2006**, *15*(3), 179-185.
- [54] Slack, L. K.; Muthana, M.; Hopkinson, K.; Suvarna, S. K.; Espigares, E.; Mirza, S.; Fairburn, B.; Pockley, A. G. Administration of the stress protein gp96 prolongs rat cardiac allograft survival, modifies rejection-associated inflammatory events, and induces a state of peripheral T-cell hyporesponsiveness. *Cell Stress Chaperones*, **2007**, *12*(1), 71-82.
- [55] Han, J. M.; Kwon, N. H.; Lee, J. Y.; Jeong, S. J.; Jung, H. J.; Kim, H. R.; Li, Z.; Kim, S. Identification of gp96 as a novel target for treatment of autoimmune disease in mice. *PLoS ONE*, **2010**, *5*(3), e9792.
- [56] Li, X.; Liu, Z.; Yan, X.; Zhang, X.; Li, Y.; Zhao, B.; Wang, S.; Zhou, X.; Gao, G. F.; Meng, S. Induction of Regulatory T Cells by High-Dose gp96 Suppresses Murine Liver Immune Hyperactivation. *PLoS ONE*, **2013**, *8*(7), e68997.
- [57] Zugel, U.; Sponaas, A. M.; Neckermann, J.; Schoel, B.; Kaufmann, S. H. gp96-peptide vaccination of mice against intracellular bacteria. *Infect. Immun.*, **2001**, *69*(6), 4164-4167.
- [58] Rapp, U. K.; Kaufmann, S. H. DNA vaccination with gp96-peptide fusion proteins induces protection against an intracellular bacterial pathogen. *Int. Immunol.*, **2004**, *16*(4), 597-605.
- [59] Hosseini Jazani, N.; Karimzad, M.; Shahabi, S. Gp96 rich lysate as a vaccine candidate against infection with Salmonella typhimurium. *Iran J. Microbiol.*, **2010**, *2*(4), 172-177.
- [60] Strbo, N.; Vaccari, M.; Pahwa, S.; Kolber, M. A.; Doster, M. N.; Fisher, E.; Gonzalez, L.; Stablein, D.; Franchini, G.; Podack, E. R. Cutting edge: novel vaccination modality provides significant protection against mucosal infection by highly pathogenic simian immunodeficiency virus. *J. Immunol.*, **2013**, *190*(6), 2495-2499.
- [61] Srivastava, P. K. Purification of heat shock protein-peptide complexes for use in vaccination against cancers and intracellular pathogens. *Methods*, **1997**, *12*(2), 165-171.
- [62] Meng, S. D.; Song, J.; Rao, Z.; Tien, P.; Gao, G. F. Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96-bound peptides. *J. Immunol. Methods*, **2002**, *264*(1-2), 29-35.
- [63] Zabrecky, J. R.; Sawlisch, W. Purification of the heat shock protein, gp96, from natural sources. *Methods*, **2004**, *32*(1), 3-6.
- [64] Seigneuric, R.; L. Markey; D.S.A. Nuyten; C. Dubernet; C.T.A. Evelo; E. Finot; Garrido, C. From Nanotechnology to Nanomedicine: applications to cancer research. *Curr. Mol. Med.*, **2010**, *10*(7), 640-652.
- [65] Brown, R. E.; Jarvis, K. L.; Hyland, K. J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.*, **1989**, *180*(1), 136-139.
- [66] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*(1), 265-275.
- [67] Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **1988**, *175*(1), 231-237.
- [68] Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **1972**, *48*(2), 422-427.
- [69] Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **1977**, *83*(2), 346-356.
- [70] Markwell, M. A.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **1978**, *87*(1), 206-210.
- [71] Wong, V. W.; Rainbow, P. S. A modified Lowry assay to measure levels of proteins lacking aromatic amino acid residues (e.g. metallothioneins). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **1984**, *78*(2), 351-353.
- [72] Winters, A. L.; Minchin, F. R. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal. Biochem.*, **2005**, *346*(1), 43-48.
- [73] Cadman, E.; Bostwick, J. R.; Eichberg, J. Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents. *Anal. Biochem.*, **1979**, *96*(1), 21-23.
- [74] Raghupathi, R. N.; Diwan, A. M. A protocol for protein estimation that gives a nearly constant color yield with simple proteins and nullifies the effects of four known interfering agents: microestimation of peptide groups. *Anal. Biochem.*, **1994**, *219*(2), 356-359.
- [75] Upreti, G. C.; Wang, Y.; Finn, A.; Sharrock, A.; Feisst, N.; Davy, M.; Jordan, R. B. U-2012: An improved Lowry protein assay, insensitive to sample color, offering reagent stability and enhanced sensitivity. *Biotechniques*, **2012**, *52*(3), 159-166.
- [76] Lovrien, R.; Matulis, D. Assays for total protein. *Curr. Protoc. Microbiol.*, **2005**, Appendix 3, Appendix 3A.
- [77] Fountoulakis, M.; Juranville, J. F.; Manneberg, M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1992**, *24*(3-4), 265-274.
- [78] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **1985**, *150*(1), 76-85.
- [79] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254.
- [80] Lopez, J. M.; Imperial, S.; Valderrama, R.; Navarro, S. An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clin. Chim. Acta*, **1993**, *220*(1), 91-100.
- [81] Okutucu, B.; Dincer, A.; Habib, O.; Zihnioğlu, F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, *70*(5), 709-711.
- [82] Doumas, B. T. Standards for total serum protein assays--a collaborative study. *Clin. Chem.*, **1975**, *21*(8), 1159-1166.
- [83] Fairburn, B.; Muthana, M.; Hopkinson, K.; Slack, L. K.; Mirza, S.; Georgiou, A. S.; Espigares, E.; Wong, C.; Pockley, A. G. Analysis of purified gp96 preparations from rat and mouse livers using 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Biochimie*, **2006**, *88*(9), 1165-1174.
- [84] Colaco, C. Autologous heat-shock protein vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, **2013**, *9*(2).
- [85] Seigneuric, R. G.; Chasse, J. L.; Auger, P.; Bardou, A. Simulated interactions between a Class III antiarrhythmic drug and a figure 8 reentry. *Acta Biotheor.*, **2005**, *53*(4), 265-275.
- [86] Schenk, U.; Westendorf, A. M.; Radaelli, E.; Casati, A.; Ferro, M.; Fumagalli, M.; Verderio, C.; Buer, J.; Scanziani, E.; Grassi, F. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.*, **2008**, *1*(39), ra6.
- [87] Atarashi, K.; Nishimura, J.; Shima, T.; Umesaki, Y.; Yamamoto, M.; Onoue, M.; Yagita, H.; Ishii, N.; Evans, R.; Honda, K.; Ta-

- keda, K. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*, **2008**, 455(7214), 808-812.
- [88] Wilhelm, K.; Ganesan, J.; Muller, T.; Durr, C.; Grimm, M.; Beilhack, A.; Krempf, C. D.; Sorichter, S.; Gerlach, U. V.; Juttner, E.; Zerweck, A.; Gartner, F.; Pellegatti, P.; Di Virgilio, F.; Ferrari, D.; Kambham, N.; Fisch, P.; Finke, J.; Idzko, M.; Zeiser, R. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat. Med.*, **2010**, 16(12), 1434-1438.
- [89] Lang, P. A.; Merkler, D.; Funkner, P.; Shaabani, N.; Meryk, A.; Krings, C.; Barthuber, C.; Recher, M.; Bruck, W.; Haussinger, D.; Ohashi, P. S.; Lang, K. S. Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity. *Eur. J. Immunol.*, **2010**, 40 (9), 2401-2408.
- [90] Trabanelli, S.; Ocadlikova, D.; Gulinelli, S.; Curti, A.; Salvestrini, V.; Vieira, R. P.; Idzko, M.; Di Virgilio, F.; Ferrari, D.; Lemoli, R. M. Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation. *J. Immunol.*, **2012**, 189(3), 1303-1310.
- [91] Dollins, D. E.; Warren, J. J.; Immormino, R. M.; Gewirth, D. T. Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol. Cell.*, **2007**, 28(1), 41-56.

Received: ?????

Revised: ?????

Accepted: ?????